

Shirley Claudino Pereira Couto

**Efeito da pentoxifilina nas vias canônica e não
canônica do NF- κ B determinantes de resposta
inflamatória em modelos suscetíveis ou não à
malária cerebral**

TESE DE DOUTORADO

Universidade de Brasília

Brasília/DF

2021

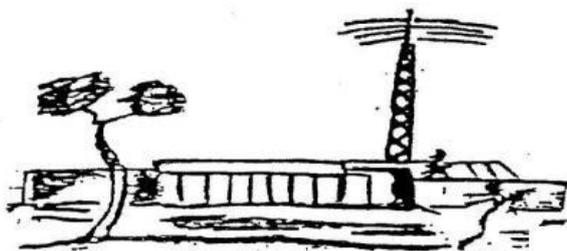
**Efeito da pentoxifilina nas vias canônica e não canônica do
NF- κ B determinantes de resposta inflamatória em modelos
suscetíveis ou não à malária cerebral**

Shirley Claudino Pereira Couto

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

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Tatiana Karla dos Santos Borges

**Tese 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 Doutor em Medicina Tropical.**



**BRASÍLIA/DF
2021**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CC071e Couto, Shirley Claudino Pereira
Efeito da pentoxifilina nas vias canônica e não canônica do NF-κB determinantes de resposta inflamatória em modelos suscetíveis ou não à malária cerebral / Shirley Claudino Pereira Couto; orientador Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira; co-orientador Tatiana Karla Dos Santos Borges. - Brasília, 2021.
231 p.

Tese (Doutorado - Mestrado em Medicina Tropical) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. Malária Cerebral. 2. Pentoxifilina. 3. Vias de sinalização do NF-κB. 4. Citocinas inflamatórias. I. Junqueira, Maria Imaculada Muniz Barboza, orient. II. Borges, Tatiana Karla Dos Santos, co-orient. III. Título.

A banca examinadora foi constituída pelos seguintes membros:

Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira (Presidente)

Érica Alessandra Rocha Alves (Membra externa - FIOCRUZ/MG)

Gustavo Adolfo Sierra Romero (Membro interno - PPGMT/UnB)

Fabiana Pirani Carneiro (Membro externo ao programa– PTL/UnB)

Cecília Beatriz Fiuza Favali (Membra suplente - PPGMT/UnB)

Dedicatória

*A Deus, luz que me guia, aos meus pais,
ao meu esposo e aos meus filhos.*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Antônia e Manoel que são meus alicerces, pelos exemplos e pelo amor que sempre me proporcionaram, e aos meus queridos irmãos.

Ao meu esposo Ademir, pelo apoio, paciência, dedicação e amor.

Aos meus filhos, eles são a razão da minha existência, Pedro Henrique, Luís Fernando e Cecília. À Fran minha norinha querida por todo carinho e atenção. À Jaciara minha norinha querida, muito obrigada pela ajuda nos experimentos e por seu amor e carinho.

Agradecimentos

À professora Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, que acreditou que eu seria capaz de superar as dificuldades e me ajudou em todos os momentos, me orientando e incentivando. Obrigada professora pelo exemplo de dedicação, respeito e amor ao próximo.

À professora Tatiana Karla dos Santos Borges, pelo apoio, orientação nos experimentos e por compartilhar seu conhecimento com dedicação e carinho. Muito obrigada.

À minha amiga e companheira de experimento Mariângela Sousa de Oliveira, pela dedicação e apoio desde o início dessa caminhada.

À professora Selma Kuckelhaus sempre com seu otimismo contagiante. Ao professor André Nicola pela orientação e apoio. E estendendo os meus agradecimentos para todos os professores da pós-graduação que contribuíram para minha formação.

À Drielly Rudenas, Aminata Dramé, Andréia Cristina Gonçalves Cascaes pela amizade, companherismo e auxílio nos experimentos.

Aos amigos do laboratório de Imunologia celular, Danilo Corazza, Lucas Fraga Friaça, Andre Cunha, Herdson Sousa.

Aos alunos e companheiros de experimentos, Marcia Duarte Firmino, Vanessa da Silva Eschimith, Davi da Silva Nunes.

E a todos que direta ou indiretamente me proporcionaram realizar esse trabalho.

Muito Obrigada!

Que a morte dos animais não tenha sido em vão e possa ter contribuído para aumentar um pouco o conhecimento científico da malária e quem sabe contribuir para um dia diminuir a ainda inaceitavelmente alta mortalidade por essa terrível doença, que ainda ceifa a vida de muitas crianças no mundo.

APOIO

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico(CNPq), processo número: 431600/2016-3.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xxii
RESUMO	xxiv
ABSTRACT	xxvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epidemiologia	2
1.2. Parasitos	5
1.3. Patogenia da malária cerebral	5
1.4. Modelos experimentais na malária	7
1.5. O papel das citocinas na malária	9
1.6. Receptores para o FNT	12
1.7. Vias de sinalização celular NF- κ B	14
1.8. Corpúsculos lipídicos	16
1.9. Óxido Nítrico	19
1.10. Imunomodulação terapêutica e papel da pentoxifilina	21
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Delineamento experimental	33
4.2. Tipos de estudo e aspectos éticos	33
4.3. Animais	34
4.3.1. Grupos do estudo	35
4.3.1.1. Curva de sobrevivência	35
4.3.1.2. Grupos de estudo para avaliação das funções do sistema imunitário	36
4.4. Inóculo	36
4.5. Tratamento com a Pentoxifilina	36
4.6. Procedimento para coleta do cérebro	37
4.6.1. Preparação do homogenato do cérebro	37
4.6.2. Obtenção da micróglia e outras células do tecido cerebral	37
4.7. Coleta e preparação dos macrófagos peritoneais	38
4.8. Coleta e preparação do sangue/soro	39

4.9.	Efeito da pentoxifilina	40
4.9.1.	Avaliação da sobrevida dos camundongos BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	40
4.9.2.	Avaliação da evolução do peso dos camundongos BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	40
4.9.3.	Avaliação do hematócrito dos camundongos BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	40
4.9.4.	Avaliação da parasitemia dos camundongos BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	41
4.9.5.	Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	41
4.9.6.	Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	42
4.9.7.	Efeito do tratamento com a Pentoxifilina na produção de citocinas	42
4.9.7.1.	Avaliação da produção de citocinas pelos macrófagos peritoneais, no soro e no homogenato do tecido cerebral dos camundongos BALB/c, CBA, C57BL/6 infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	42
4.10.	Avaliação da expressão dos receptores para o FNT- α , das moléculas das vias canônica e não canônica do NF- κ B nas micróglia e outras células do tecido cerebral de camundongos BALB/c, CBA, C57BL/6 infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	44
4.10.1.	Estratégias para leitura no citometro	49
4.11.	Análises estatísticas	51
5.	RESULTADOS	52
5.1.	Curva de sobrevida	53
5.2.	Evolução do peso	54
5.3.	Hematócrito, parasitemia	57
5.4.	Corpúsculos lipídicos	60
5.5.	Óxido Nítrico	63
5.6.	Citocinas	65

5.6.1.	Fator de necrose tumoral (FNT- α)	65
5.6.2.	Interleucina 6 (IL-6)	69
5.6.3.	Interferon- γ (IFN- γ)	72
5.6.4.	Interleucina 12 (IL-12p70)	75
5.6.5.	Interleucina 10 (IL-10)	77
5.6.6.	Interleucina 2 (IL-2)	80
5.6.7.	Interleucina 4 (IL-4)	82
5.6.8.	Interleucina 17A (IL- 17A)	84
5.6.9.	Quimiocina CCL2 (MCP-1)	86
5.7.	Receptores para o FNT	93
5.8.	Moléculas da via do NF κ B	102
5.8.1.	FADD	103
5.8.2.	TRAF	105
5.8.3 .	NIK	109
5.8.4 .	JNK	111
5.8.5 .	I κ B	114
5.8.6 .	RelA	116
5.8.7 .	RelB	118
5.8.8 .	c-Rel	120
5.8.9.	p50	121
5.8.10.	p52	123
5.9.	Comparação das moléculas finais da via do NF- κ B	124
6.	DISCUSSÃO	134
7.	CONCLUSÕES	161
8.	REFERÊNCIAS	172
9.	ANEXO – COMITÊ	201

LISTA DE ABREVIATURAS

15-LO- 15 lipoxigenase

APC – alofiocianina (fluorocromo)

ARNm – ácido ribonucleico mensageiro

CO₂ - gás carbônico

COX-2 – ciclooxigenase 2

COX - ciclooxigenase

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

ERK – cinase reguladora do sinal extracelular

FADD – proteína contendo domínio de morte associado ao FAS

FITC – isotiocianato de fluoresceína (fluorocromo)

FNT- α – fator de necrose tumoral alfa

GPI – glicofosfatidil inositol

HBSS - solução balanceada de Hanks

IC – índice corpuscular

ICAM-1 – molécula de adesão intercelular 1

IFM – intensidade de fluorescência média

IFN- γ – interferon gama

I κ B – inibidor dos fatores nucleares - κ B (variantes: I κ B α , I κ B κ , I κ B ϵ)

IKK – cinase inibidora da cinase κ B (variantes α , β , δ)

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase indutível

JNK – cinase c-jun N terminal

κ B – elemento nuclear κ B

LPS – lipopolissacarídeo

LTX – linfotóxina (variantes: $LT\alpha$, $LT\alpha\beta$ e $LT\beta$)

MCP-1 – proteína quimiotática para monócitos 1

MAP3K14 – proteína quinase quinase 14 ativada por mitógeno, também conhecida como quinase indutora do NF- κ B (NIK)

MAP – proteína cinase ativadora

MAPK – proteína cinase ativadora de mitógeno

MyD88 – proteína de resposta primária a diferenciação mielóide

NADPH – fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido

NaNO₂ – nitrito de sódio

NEMO – modulador essencial dos fatores nucleares κ B

NF- κ B – elemento nuclear que se liga aos elementos – κ B no ADN

NIK – cinase indutora do NF κ B

NO – óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

p100 – proteína precursora do p52

p105 – proteína precursora do p50

p50 – fator nuclear do NF- κ B p50 (nfb1)

p52 – fator nuclear do NF- κ B p52 (nfb2)

PAMP – padrão molecular de patógeno

Pb- Plasmodium berghei

PECAM – molécula de adesão celular endotelial plaquetária

PE – ficoeritrina (fluorocromo)

PfEMP1 – proteína de citoaderência ligado ao gene assexual do *Plasmodium*

PGG2 – prostraglandina G2

PPAR – receptor ativado de proliferação peroxissomal

Ptx- pentoxifilina

r1FNT/p55 – receptor 1 do fator de necrose tumoral

r2FNT/p75 – receptor 2 do fator de necrose tumoral

RelA – fator nuclear do NF- κ B p65

RelB – fator nuclear do NF- κ B p68

rFNT- receptor do fator de necrose tumoral

rLT β – receptor beta da linfotoxina

rLTX – receptor para linfotoxina

SAB – soro albumina bovina

SOD – superóxido dismutase

STF- salina tamponada com fosfato

STAT – sinal de transdução e ativador da transcrição

Ta1 – linfócitos T auxiliar (CD4+) do ramo de resposta 1

Ta2 – linfócitos T auxiliar (CD4+) do ramo de resposta 2

Tc – linfócito T citolítico

TLCK - n- a-tosyl-l-lysine chloromethyl ketone hydrochloride

TRAF- fator associado ao receptor de FNT

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	33
Desenho experimental	
Figura 2	45
Imagem retirada de Taylor e cols (2016), mostrando na via do NF- κ B as moléculas que foram quantificadas, e que estão identificadas dentro dos quadros marcados em verde	
Figura 3	50
Dot plot e histograma mostrando a estratégia de avaliação por citometria de fluxo, mostrando a seleção da população de interesse	
Figura 4	50
Dot plot e histograma mostrando a estratégia de avaliação por citometria de fluxo, mostrando a seleção das células positivas para marcação da micróglia	
Figura 5	54
Avaliação da curva de sobrevivência dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA	
Figura 6	55
Avaliação do peso dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 no dia zero	
Figura 7	56
Avaliação do delta peso dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA	
Figura 8	58
Avaliação do hematócrito dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA	
Figura 9	59
Avaliação da parasitemia dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA	

Figura 10	62
Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados e ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 11	63
Comparação da produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados e ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 12	64
Avaliação da produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 13	65
Comparação da produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 14	67
Avaliação da produção de FNT- α no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do tecido cérebral dos camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 15	68
Comparação da produção de FNT- α no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do tecido cérebral dos camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 16	70
Avaliação da produção de IL-6 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados e não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 17	72
Comparação da produção de IL-6 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados e não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	

Figura 18	74
Avaliação da produção de INF- γ no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 19	74
Comparação da produção de INF- γ no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 20	76
Avaliação da produção de IL-12p70 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 21	77
Comparação da produção de IL-12p70 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 22	79
Avaliação da produção de IL-10 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 23	80
Comparação da produção de IL-10 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 24	81
Avaliação da produção de IL-2 no soro e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 25	82
Comparação da produção de IL-2 no soro e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	

Figura 26	83
Avaliação da produção de IL-4 no soro, e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 27	83
Comparação da produção de IL-4 no soro, e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 28	85
Avaliação da produção de IL-17A no soro e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 29	85
Comparação da produção de IL-17A no soro e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 30	87
Avaliação da produção de MCP-1 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 31	88
Comparação da produção de MCP-1 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 32	97
Avaliação da expressão dos receptores para o FNT na micróglia de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 33	98
Histograma- Avaliação da intensidade de fluorescência média nos receptores para o FNT, na micróglia de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	

Figura 34	98
Comparação da expressão dos receptores para o FNT na micróglia de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 35	99
Comparação da expressão dos receptores para o FNT(r1 FNT, r2FNT, rLTX) por modelo, nos 3 modelos estudados, na micróglia de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 36	100
Avaliação da expressão dos receptores para o FNT nas outras células cerebrais de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 37	101
Comparação da expressão dos receptores para o FNT (r1FNT, r2FNT, rLTX) por grupo, nos três modelos estudados, nas outras células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 38	102
Comparação da expressão dos receptores para o FNT(r1 FNT, r2FNT, rLTX) por modelo, nos 3 modelos estudados, nas células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 39	104
Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula FADD na micróglia e em células cerebrais de animais infectados e não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 40	104
Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula FADD na micróglia e em células cerebrais de animais infectados e não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 41	106
Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula TRAF na micróglia e em células cerebrais de animais infectados e não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	

Figura 42	106
Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula TRAF na micróglia e em células cerebrais de animais infectados e não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 43	107
Comparação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula FADD e TRAF nos três modelos estudados, na micróglia de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 44	108
Comparação da Intensidade de Fluorescência Média das moléculas FADD e TRAF nos três modelos estudados, nas outras células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 45	110
Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula NIK na micróglia e em células cerebrais de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 46	111
Comparação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula NIK nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 47	112
Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula JNK na micróglia e em células cerebrais de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 48	112
Comparação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula JNK nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	
Figura 49	113
Comparação da Intensidade da Fluorescência Média das moléculas NIK e do JNK nos três modelos estudados, na micróglia de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	

Figura 50	114
<p>Comparação da Intensidade de Fluorescência Média das moléculas NIK e do JNK nos três modelos estudados, nas outras células do tecido cerebral de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 51	115
<p>Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula IκB na micróglia e em células cerebrais de animais infectados e não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 52	116
<p>Comparação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula IκB nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 53	117
<p>Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula RelA na micróglia e em células cerebrais de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 54	118
<p>Comparação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula RelA nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 55	119
<p>Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula RelB na micróglia e em células cerebrais de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 56	119
<p>Comparação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula RelB nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 57	120
<p>Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula c-Rel em células do SNC de animais infectados e não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	

Figura 58	120
<p>Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula c-Rel nos três modelos estudados em células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 59	122
<p>Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula p50 em células do SNC de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 60	122
<p>Comparação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula p50 nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 61	123
<p>Avaliação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula p52 em células da micróglia e do SNC de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 62	124
<p>Comparação da Intensidade de Fluorescência Média da molécula p52 nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 63	125
<p>Comparação da Intensidade de Fluorescência Média de RelA, RelB, P50 e p52 nos três modelos estudados, na micróglia de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 64	125
<p>Histograma- Comparação da intensidade de fluorescência média nas moléculas p50, p52, RelA, RelB, na micróglia de animais infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	
Figura 65	126
<p>Comparação da Intensidade de Fluorescência Média de RelA, RelB, P50 e p52 nos três modelos estudados, nas outras células cerebrais de camundongos infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA</p>	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	56
Avaliação do peso dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6, infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
Tabela 2	58
Avaliação do hematócrito dos animais BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
Tabela 3	59
Avaliação da parasitemia dos animais BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
Tabela 4	61
Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais dos animais BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
Tabela 5	64
Avaliação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais, dos animais BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
Tabela 6	89
Avaliação da produção das citocinas FNT- α , IL-6, INF, IL-12, IL-10, IL-2, IL-4, IL-17A e da quimiocina CCL2 (MCP-1) no soro dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados e ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
Tabela 7	91
Avaliação da produção das citocinas FNT- α , IL-6, INF- γ , IL-12, IL-10, IL-2, IL-4, IL-17A e da quimiocina CCL2 (MCP-1) no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados e ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
Tabela 8	92
Avaliação da produção das citocinas FNT- α , IL-6, INF- γ , IL-12, IL-10, IL-2, IL-4, IL-17A e da quimiocina CCL2 (MCP-1) nos homogenatos do tecido cerebral dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
Tabela 9	127
Dados esquematizados do resultado da curva de sobrevida, peso, parasitemia, óxido nítrico e corpúsculos lipídicos.	

Tabela 10	128
Dados esquematizados do resultado das citocinas.	
Tabela 11	129
Dados esquematizados do resultado dos receptores para o FNT- α e das moléculas da via do NF- κ B por modelo.	
Tabela12	129
Dados esquematizados do resultado das moléculas da via do NF- κ B por modelo.	
Tabela13	130
Dados esquematizados do resultado dos receptores para o FNT- α e das moléculas da via do NF- κ B – comparação entre os grupos dos três modelos.	
Tabela14	131
Dados esquematizados do resultado dos receptores para o FNT- α e das moléculas da via do NF- κ B – comparação entre os grupos dos três modelos.	
Tabela15	132
Dados esquematizados do resultado da comparação das moléculas por modelo.	
Tabela16	133
Dados esquematizados do resultado da comparação das moléculas por modelo.	
Tabela17	170
Resumo dos resultados da curva de sobrevida, peso, anemia, parasitemia, corpúsculos lipídicos e óxido nítrico.	
Tabela18	170
Resumo dos resultados das citocinas no soro e no homogenato.	
Tabela19	171
Resumo dos resultados dos receptores e das moléculas do NF- κ B na micróglia.	

RESUMO

A pentoxifilina (Ptx) tem ação pleiotrópica sobre o sistema imunitário e modula a produção da citocina inflamatória fator de necrose tumoral- α (FNT- α) que participa dos mecanismos fisiopatogênicos das formas cerebrais da malária. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da Ptx nas vias de ativação do NF- κ B, via que controla a resposta inflamatória que está envolvida na patogênese das formas graves da malária. Foram estudados camundongos susceptíveis (CBA e C57BL6) e resistentes (BALB/c) à malária cerebral (MC). Grupos de estudo: 1) controle (C), 2) tratado com a Ptx (Ptx), 3) Infectado pelo *P.berghei* ANKA (Pb) 4) Infectado e tratado com Ptx (Pb+Ptx). O tratamento foi feito do terceiro ao sexto dia de infecção, por via oral. Avaliou-se curva de sobrevivência, parasitemia, hematócrito, peso, produção de corpúsculos lipídicos, de citocinas, expressão de receptores para o FNT- α e moléculas da via do NF- κ B por citometria de fluxo. Foram estudados em macrófagos peritoneais, micróglia, soro e/ou homogenato do tecido cerebral. A infecção malárica aumentou a expressão dos corpúsculos lipídicos nos três modelos e induziu maior produção das citocinas inflamatórias FNT- α , IFN- γ , IL-6 e a MCP-1. O perfil de resposta imune, avaliado pela produção das citocinas no homogenato do tecido cerebral mostrou predomínio Ta2 no CBA e Ta1 e Ta17 no C57BL6 e BALB/c. Houve menor expressão do r1TNF e maior do rLTX em todos os modelos. Das moléculas da via do NF- κ B, o Rel A (via canônica) foi a molécula mais expressa em todos os grupos e o RelB (via não canônica) teve menor expressão na maioria dos grupos. No BALBc, a expressão do p50 e p52 mostrou-se homogênea nos grupos. No CBA e C57BL6, houve menor expressão da molécula p52 do que p50, sugerindo ativação preferencial da via canônica; enquanto que no BALBc teve ativação equilibrada de ambas as vias. No C57BL6, que apresenta a forma mais grave da doença e mortalidade mais precoce, houve maior expressão de RelA e p50 (via canônica). A infecção malárica aumentou a expressão do rLTX no BALB/c, mas diminuiu a expressão de RelA e p52 no CBA, e p50 e p52 no C57BL/6. O tratamento com a Ptx aumentou a sobrevivência e a expressão do FADD no modelo CBA, mas diminuiu a expressão de corpúsculos lipídicos, das moléculas RelA e p52, e a concentração da IL-2 nesse modelo. No C57BL/6, a Ptx reduziu a concentração de IL-6, IL-2 e IL-17, e a expressão de p50 e p52, mas aumentou a expressão do NIK e do TRAF. No BALB/c a Ptx modulou negativamente a IL-6 e o RelA. Os três modelos apresentaram perfis de respostas de citocinas e de moléculas da via do NF- κ B diferentes sugerindo que os mecanismos imunopatogênicos da doença malárica foram diferentes. O perfil de ativação da via do NF- κ B foi particular para cada modelo com predomínio de ativação da via canônica em todos, mas no BALB/c parece ter havido um maior equilíbrio da resposta com perfil de ativação da via canônica e não canônica de menor intensidade do que para os outros modelos. As diferenças entre os modelos estudados nas vias de ativação do NF- κ B e na produção das citocinas à infecção malárica podem explicar as respostas diferentes dos três modelos ao tratamento dos animais infectados com a Ptx.

ABSTRACT

The pentoxifylline (Ptx) has pleiotropic action on the immune system and modulates the production of the inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α), which participates in the pathophysiological mechanisms of the cerebral forms of malaria. The effect of Ptx on NF- κ B activation pathways, the pathway that control the inflammatory response involved in the pathogenesis of severe forms of malaria, was evaluated. Susceptible (CBA and C57BL6) and resistant (BALB/c) mice to cerebral malaria (MC) were studied. Study groups: 1) control (C), 2) treated with Ptx (Ptx), 3) Infected with *P. berghei* ANKA (Pb) 4) Infected and treated with Ptx (Pb+Ptx). Treatment was done from the third to the sixth day of infection, per os. The survival curve, parasitemia, hematocrit, weight, expression of lipid bodies, cytokine production, expression of receptors to TNF- α and molecules of the NF- κ B pathway were evaluated. Optical microscopy and flow cytometry were used. They have been studied in peritoneal macrophages, microglia, serum and/or brain tissue homogenate. Malarial infection increased the expression of lipid bodies in the three models. There was higher production of the inflammatory cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-6 and MCP-1. The immune response profile, evaluated by the production of cytokines in the brain tissue homogenate, showed the predominance of Th2 response in the CBA, and Th1 and Th17 response, in the C57BL6 and BALB/c. There was lower expression of r1TNF and higher expression of rLTX in all models. Rel A (canonical pathway) was the most expressed molecule in all groups and RelB (non-canonical pathway) was less expressed in almost groups. In BALBc, the expression of p50 and p52 was homogeneous in all groups. In CBA and C57BL6, there was less expression of the p52 molecule than p50, suggesting preferential activation of the canonical pathway; while BALBc had balanced activation of both pathways. C57BL6 has the most severe form of the disease, earlier mortality, higher expression of RelA and p50. Malarial infection increased rLTX expression in BALB/c, but decreased RelA and p52 expression in CBA, and p50 and p52 expression in C57BL/6. Ptx increased CBA survival and FADD expression, but decreased expression of lipid bodies, RelA and p52 molecules, and IL-2 concentration. In the C57BL/6 mice, Ptx reduced the concentration of IL-6, IL-2 and IL-17, and the expression of p50 and p52, but increased the expression of NIK and TRAF. In the BALB/c, Ptx downmodulated IL-6 and RelA. The three models showed different profiles of cytokines and molecules of the NF κ B pathway, suggesting that the immunopathogenic mechanisms of malarial disease were different for each model. The activation profile of the NF- κ B pathway was particular for each model with a predominance of canonical pathway activation in all, but BALB/c shows a better balanced response between canonical and non-canonical pathway than the other models. The differences in the NF- α B activation pathways and in the production of cytokines to malarial infection between the models studied may explain the different responses of the three models to the treatment of animals infected with Ptx.

INTRODUÇÃO

1.1. Introdução e Epidemiologia

Embora os resultados referentes ao número de casos de malária no mundo (WHO, 2020) e no Brasil (Oliveira-Ferreira, 2010; Lapouble e cols, 2015) tenham mostrado uma tendência promissora à diminuição, o número de casos ainda é superlativo e representa um tremendo desafio em relação ao seu tratamento e controle. Aproximadamente 229 milhões de pessoas adoecem e 409 mil pessoas ainda morrem por ano vítimas da malária, sendo que 94% dos casos e mortes ocorreram na África (WHO, 2020). As mulheres grávidas e crianças menores de 5 anos são as mais acometidas pela infecção causada pelo plasmódio. Na gravidez a infecção malárica aumenta o risco de morte para mãe, para o feto e para o recém-nascido. O sequestro placentário do parasita pode levar à anemia materna, colocando a mãe em maior risco de morte antes e depois do parto, contribui para natimortos e prematuros e também pode levar ao baixo crescimento fetal e baixo peso ao nascer, o que, por sua vez, pode levar ao retardo do crescimento infantil e a distorções cognitivas (Guyatt e Snow, 2001; Guyatt e Snow, 2004; WHO, 2017; WHO, 2020).

Na América, estima-se que 138 milhões de pessoas em 19 países e territórios estão em risco para malária, das quais, quase 80% são determinadas pelo *Plasmodium vivax*. Três países, Brasil, Colômbia e Venezuela, respondem por 80% de todos os casos estimados. No Brasil em 2019 foram notificados 157.454 casos de malária, destes 17.139 casos foram de malária *falciparum* e malária mista. No primeiro semestre de 2020, foram registrados 60.713 casos de malária, sendo 8.758 casos de malária *falciparum* e malária mista (Brasil, 2020).

No Brasil a maioria dos casos de malária se concentra na região Amazônica, área endêmica para a doença. O Distrito Federal não é considerado área de transmissão de malária, porém no primeiro semestre de 2020 foi registrado 1 caso autóctone (Brasil, 2020). Entretanto, um número significativo de casos importados de outras regiões do país e mesmo de outros países, são registrados no DF todos os anos (Brasil, 2020).

Vários fatores aumentam o risco de desenvolvimento das formas graves da malária, como o nível de imunidade, que está relacionado à extensão passada de exposição ao parasito, o retardo no diagnóstico, retardo para iniciar o tratamento, ausência de um suporte clínico adequado, a resistência às drogas antimaláricas, dificuldade de acesso à terapêutica apropriada e susceptibilidade genética individual à infecção, entre outras (Marsh, 1992; Miller, 2002; Phillips e cols, 2017).

A utilização do tratamento combinado com derivados de artemisinina (ACT) tem representado uma das medidas mais eficientes no controle da doença, entretanto, o aparecimento de mutações levando à resistência parcial aos derivados combinados de artemisinina tem sido descrito em vários locais (WHO, 2020) e estudos de eficácia têm mostrado diminuição da sensibilidade do *P. falciparum* aos ACT na Guiana, Guiana Francesa e no Suriname, o que representa uma ameaça de surgimento de resistência ao *P. falciparum* no Brasil, pelo intenso fluxo de pessoas, particularmente garimpeiros, entre os países que fazem parte do Escudo Guianês (Gama e cols, 2011; Nacher e cols, 2013; Vreden e cols, 2013). Esse extenso e crescente problema de resistência às drogas antimaláricas coloca dificuldades ao tratamento, como a necessidade de adotar um grande espectro de arsenal terapêutico para permitir a associação de drogas, acrescido da necessidade de também lidar com os diferentes estágios do ciclo de vida do parasita. Ademais, importantes questões ainda permanecem sem resposta. Por que alguns pacientes desenvolvem as formas graves e alguns morrerão, enquanto a maioria dos indivíduos infectados pelo parasito não apresentam as formas graves e letais da doença (Muniz-Junqueira, 2007; Wassmer e cols, 2015)?

Tem sido reconhecido que a desregulação do sistema imunitário tem importante participação nos mecanismos de patogênese da anemia e das formas cerebral, renal e pulmonar, as quais caracterizam as formas graves e complicadas da doença (Mohan e cols, 2008; Sarkar e cols, 2010; Miller e cols, 2013). A fisiopatologia da malária cerebral ainda é pouco compreendida, e está associada à obstrução microvascular e resposta inflamatória excessiva. Estudos em humanos e camundongos mostraram que a produção exacerbada

de citocinas inflamatórias na infecção pelo *Plasmodium falciparum* caracteriza a imunopatogenia da malária cerebral, com o sequestro de eritrócitos parasitados ou não, plaqueta e leucócitos na microvasculatura cerebral (Idro e cols, 2007; Craig e cols, 2012; Palomo e cols, 2015; Dunst e cols, 2017; Wang e cols, 2018; Plewes e cols, 2018). A hiperativação do sistema imunitário pelos componentes do parasita, com superprodução de citocinas inflamatórias, é considerada decisiva para a patogênese da malária grave (Clark e Cowden, 2003; Hunt e Grau, 2003; Randall e Engwerda, 2010). Moléculas de superfície do merozoíta do plasmódio induzem a expressão de muitos genes nas células do hospedeiro que são implicados na patogênese da doença, como fator de necrose tumoral- α (FNT- α), linfotóxina (LT), IL-1, IL-12, óxido nítrico sintase induzível e muitas moléculas de adesão que são expressas na superfície do endotélio vascular e são reconhecidas pela molécula EMPf1 do *P. falciparum* (Cooke e cols, 2000; Rasti e cols, 2004; Randall e cols, 2010), mas induzem também moléculas envolvidas na proteção, como o PPAR- γ (Bopp e cols, 2010). Entretanto, apenas a elevada carga parasitária não explica totalmente as diferentes gravidades da doença.

A ativação do macrófago pelo interferon- γ , produzido principalmente pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, aumenta ainda mais a produção do FNT- α por aumentar os níveis do ARN mensageiro desta citocina, além de aumentar a expressão dos receptores para o FNT- α na superfície das células alvo (Lou e cols, 2001). Entretanto, tanto o FNT- α (Muniz-Junqueira e cols, 2001) quanto o IFN- γ (Ângulo e Fresno, 2002) têm efeitos antiplasmódio e estão associados com as formas benignas da malária. Porém, se estas citocinas são produzidas em excesso ou estimulam um endotélio hiper-reativo, podem ter um papel importante na patogênese das formas graves da doença (Ângulo e Fresno, 2002; Muniz-Junqueira, 2007; Tosta e Muniz-Junqueira, 2011, Tosta e Muniz-Junqueira, 2013, Muniz-Junqueira e cols, 2021). Tem sido sugerido também que o aumento local da linfotóxina- α seria um dos mediadores principais da malária cerebral murina (Engwerda e cols, 2002).

1.2. Parasitos

A malária no homem pode ser causada por sete espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. simium* e *P. cynomolgy* (Lee e cols., 2011; Muniz-Junqueira, 2021). Embora ocorra maior número de casos de infecções pelo *P. vivax*, as infecções ocasionadas pelo *P. falciparum* são responsáveis pelas formas mais graves. Em relação ao *P. ovale*, nunca foi registrada transmissão autóctone no Brasil, estando restrita a determinadas regiões do continente africano, e no Brasil ocorre apenas como casos importados. O *P. knowlesi* e o *P. cynomolgy* tem ocorrência apenas no Sudeste Asiático (Brasil 2009, 2010, 2017; Imwong e cols, 2019). Em 2015 e 2016 ocorreu surto de malária pelo *P. simium* na Mata Atlântica – Rio de Janeiro (Brasil e cols, 2017).

1.3. Patogenia da malária cerebral

A forma cerebral da malária é uma consequência do envolvimento difuso dos capilares cerebrais e vênulas pós-capilares. O processo começa com a aderência do eritrócito parasitado pelo *P. falciparum* às células endoteliais ou aos eritrócitos vizinhos. Este sequestro pode interferir com o fluxo sanguíneo cerebral local e, portanto, facilitar o acúmulo de leucócitos, que são ativados pelos produtos liberados pelo parasito durante a multiplicação local (Bate e cols, 1988). A citoaderência resulta em sequestro de eritrócitos parasitados nos capilares e vênulas pós-capilares, causando bloqueio heterogêneo da microcirculação e hipóxia tecidual (Silamut e cols, 1999; Plewes e cols, 2018).

Além da obstrução do fluxo por eritrócitos parasitados sequestrados, acredita-se que o fluxo microcirculatório esteja ainda mais comprometido pela maior rigidez de eritrócitos infectados e não infectados e aglomeração de eritrócitos infectados (autoaglutinação mediada por plaqueta) e eritrócitos não infectados aderidas a eritrócitos infectados (formação de roseta) (Dondorp e cols, 2004; Plewes e cols, 2018). A produção local de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos e macrófagos ativados, particularmente o

FNT- α e linfotóxina, de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, leva à ativação das células endoteliais e, eventualmente, ao dano destas células e das células vizinhas (Schofield e Grau, 2005).

Após ativação, as células endoteliais aumentam a produção de óxido nítrico e a expressão de moléculas de aderência, as quais agravam ainda mais o sequestro dos eritrócitos parasitados. As consequências das alterações endoteliais são o edema perivascular, hipóxia do parênquima cerebral circunvizinho, petéquias e hemorragias. Dependendo da extensão do dano estrutural cerebral e do grau de distúrbio metabólico, o envolvimento cerebral pode evoluir para múltiplas convulsões e coma (Turner, 1997; Tosta e Muniz-Junqueira, 2006; 2009; Muniz-Junqueira, 2007; Muniz-Junqueira e Tosta, 2007; Mishra e cols, 2007; Mishra e Newton, 2009; Tosta e Muniz-Junqueira, 2011; Razakandrainibe e cols, 2013). Tem também sido sugerido que a produção excessiva de óxido nítrico pode estar envolvida no desenvolvimento do coma pela ação moduladora do NO sobre a transmissão de sinal na sinapse neuronal (Mendis e Carter, 1995), como também pela formação de peroxinitritos com lesão tecidual (Tosta e Muniz-Junqueira, 2011).

A característica central da infecção pelo *P. falciparum* é o sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação de vários órgãos, principalmente cérebro e pulmão. O sequestro exacerbado é uma consequência direta do desequilíbrio de citocinas, principalmente a superprodução do FNT- α /linfotóxina. Estas citocinas aumentam a expressão de moléculas de aderência nas paredes do endotélio vascular, que, conseqüentemente, aumentam o processo de sequestro e a gravidade da doença (Ângulo e Fresno, 2002; Tosta e Muniz-Junqueira, 2005; Muniz-Junqueira, 2007; Sarkar e cols, 2010; Grau e Craig, 2012).

1.4. Modelos experimentais da malária

Camundongos geneticamente idênticos de várias linhagens têm sido utilizados no estudo da malária experimental na tentativa de elucidar a fisiopatologia da doença, ainda pouco esclarecida. O modelo animal aliado à cepa do plasmódio permite estudar aspectos diversos das formas graves da malária por assemelhar-se em alguns sinais clínicos e respostas imunológicas à malária humana (Lou e cols, 2001; de Souza e Riley, 2002; Borges, 2006; de Souza e cols, 2010; Craig e cols, 2012). Há divergências entre os pesquisadores quanto a pertinência da utilização de modelo animal experimental na malária. Para White e cols (2010), os mecanismos fisiopatológicos determinantes da malária humana são diferentes em alguns aspectos dos que ocorrem na malária experimental. Como no modelo C57BL/6, infectado com o *Plasmodium berghei* ANKA, em que predomina o sequestro de leucócitos, enquanto em seres humanos predomina o sequestro de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral. Isso ocorre possivelmente por diferenças nos fenótipos de moléculas de adesão (de Souza e Riley, 2002; Borges, 2013). Todavia, vários aspectos da malária nos modelos murinos são semelhantes ao que ocorrem em seres humanos. Um melhor entendimento e melhor análise da analogia e das diferenças das respostas entre os diversos modelos experimentais poderão colaborar para elucidar os mecanismos imunopatogênicos da malária em seres humanos também (Borges, 2013).

A linhagem BALB/c, que é considerada resistente à forma cerebral da malária, mas apresenta alterações histopatológicas no tecido cerebral (Lacerda-Queiroz, 2007; Corazza, 2015) quando infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, não apresenta quadro clínico neurológico com agregação de leucócitos na microvasculatura cerebral (Borges, 2006), porém, desenvolvem mais tardiamente anemia grave ocasionada pela destruição e redução na produção dos eritrócitos (de Kossodo e Grau, 1993). Várias fatores determinam a anemia na malária, entre elas o rompimento elevado de eritrócitos, que é consequência da utilização da hemoglobina pelo plasmódio,

e a remoção dos eritrócitos infectados e não infectados no baço (Miller e cols, 1989; Evans e cols, 2006; Borges, 2006) e principalmente pelo multiplicação intraeritrocitária do parasito (de Kossodo e Grau, 1993). Ademais há a formação de anticorpos contra os eritrócitos, agravando ainda mais o quadro da anemia (Helegbe e cols, 2009).

As linhagens CBA e C57BL/6 são susceptíveis à forma cerebral da doença quando infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA e evoluem para um quadro neurológico com ataxia, paralisia dos membros em graus diversos, convulsão e coma, semelhante aos sinais clínicos que ocorrem na malária humana (Smith e cols, 1994; Rae e cols, 2004; Borges, 2006; Muniz-Junqueira, 2007). Alterações nas estruturas cerebrais vasculares e metabólicas são semelhantes às que ocorrem na malária cerebral humana, ocasionada principalmente pelo aparecimento de edema cerebral, hemorragia, hipóxia, rompimento da barreira hemato-encefálica e redução do fluxo sanguíneo cerebral, desencadeando um quadro de isquemia cerebral (Medana e cols, 2000; Sanni e cols, 2001; Penete cols, 2005; Borges, 2006).

Alguns pontos importantes divergem a malária cerebral humana da murina. Ocorre um sequestro exacerbado de eritrócitos infectados agregando também eritrócitos não infectados, decorre em menor intensidade agregação de leucócitos na microvasculatura cerebral na malária humana, enquanto no modelo CBA, a malária cerebral cursa com sequestro exacerbado de leucócitos e uma moderada agregação de eritrócitos parasitados (Silamut e cols, 1999; Hearn e cols, 2000, Borges, 2006). Os camundongos C57BL/6, após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, desenvolvem malária cerebral com sinais neurológicos, congestão vascular, adesão de células e eritrócitos, lesão tecidual e um menor número de neurônios (Baptista e cols 2010; Craig e cols. 2012; Corazza, 2015).

Apesar da intensa discussão sobre a utilização de modelos animais para o estudo da malária cerebral, é consenso a importância de estudos controlados nestes modelos (de Souza e cols, 2002; de Souza e cols, 2010; Craig e cols, 2012; Grau e Craig, 2012). A utilização de modelos murinos com diferentes susceptibilidades à infecção malárica poderá ajudar no melhor

entendimento destas alterações. Possivelmente, esta melhor compreensão permitirá acrescentar novos procedimentos imunomodulatórios à terapia antiparasitária da malária. A possibilidade de manipular a resposta do sistema imunitário ao parasita possivelmente mudará o enfoque de tratamento da malária para o de prevenção de gravidade, diminuindo assim a inaceitavelmente alta morbidade e mortalidade pela doença. Os mecanismos relacionados às vias de ativação intracelulares desencadeadas pelo fator de necrose tumoral e que culminam em sua produção precisam ainda ser melhor esclarecidos na malária.

1.5. O papel das citocinas na malária

Várias citocinas inflamatórias participam da defesa do hospedeiro contra a infecção pelo plasmódio, entretanto se produzidas em excesso podem agravar a infecção (Mitchell e cols. 2005; Muniz-Junqueira e Tosta 2007). Já foi visto que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (FNT- α), o interferon- γ (IFN- γ), interleucina-6 (IL-6) e IL-12 estão relacionados com as formas graves de malária (Ângulo e Fresno. 2002; Mitchell et al. 2005). Na infecção pelo plasmódio, inicialmente os macrófagos secretam IL-12 que estimulam as células NK e linfócitos TCD8+ a produzirem FNT- α que tem papel importante no controle da infecção, e células NK e LTCD4+ produzem IFN- γ , ativando a resposta imunológica (Plebanski e Hil, 2000). Entretanto, quando a infecção pelo plasmódio evolui para as formas graves da malária, tem-se uma produção excessiva e persistente do FNT- α e uma redução na produção de IL-10 (Dodo e cols. 2002).

Monócitos, células endoteliais e fibroblastos produzem IL-6, que também participa da resposta imunológica (Gomes e cols, 2009). Na infecção malárica a IL-6 participa dos mecanismos de defesa do hospedeiro contribuindo para inibir o desenvolvimento do plasmódio na fase hepática da infecção (Vreden e cols, 1992; Nussler e cols, 1991). Entretanto, como ocorre para as outras citocinas, um aumento excessivo de sua expressão está

relacionado com o desenvolvimento das formas graves da malária (Lyke e cols, 2004). Pacientes apresentando formas moderada ou grave da infecção pelo *Plasmodium falciparum*, durante a fase aguda da doença e mesmo após o tratamento, apresentam níveis elevados de IL-6 (Wenisch e cols, 1999). Em camundongos CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA ou *Plasmodium yoelii* verificou-se que a IL-6 estava em níveis muito elevados, sugerindo que a IL-6 está relacionada com as várias formas da infecção, pois o *Plasmodium berghei* ANKA leva ao desenvolvimento de malária cerebral no camundongo CBA e o *Plasmodium yoelii* não causa malária cerebral (Grau e cols, 2003).

A IL-12, produzida por macrófagos, participa da imunidade celular e da resposta imune mediada por anticorpos na infecção pelo plasmódio (Malaguarnera e cols, 2002). Foi visto que a concentração de IL-12 estava diretamente relacionada com a alta parasitemia em indivíduos infectados pelo *Plasmodium falciparum* (Luty e cols, 2000). Kondadasula e cols (2008) e Fauconnier e cols (2012) sugerem que a participação da IL-12 na defesa imunológica contra os plasmódios está associada à capacidade do receptor para a IL-12 de ativar a via STAT/ERK, que é primordial para a produção de FNT- α , linfotóxina α e β e IFN- γ .

O papel da citocina IL-17 na infecção por plasmódio ainda não está muito claro. Produzida por linfócitos T CD4 auxiliar 17, está relacionada com a indução de citocinas inflamatórias e quimiocinas. Foi relatado que a IL-17 está associada com a imunidade em pacientes co-infectados com o *Plasmodium falciparum* e com a *Wulchereria bancrofti* (Metenou e cols, 2011) e em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* (Bueno e cols, 2012). Foi demonstrado que a IL-17 estimula a produção de quimiocinas relevantes para o recrutamento de neutrófilos e linfócitos T CD8+, que podem participar tanto da imunidade quanto da imunopatogenia das formas graves da malária (Campanella e cols, 2008; Miu e cols, 2008; Ouyang e cols, 2008; Van den Steen e cols, 2008).

Foi visto que células imunológicas e estromais secretam MCP-1 após a ativação dos receptores de reconhecimento de padrão (RRP) ou depois da

estimulação por citocinas (Griffith e cols, 2014; Proudfoot e cols, 2003). A MCP-1 por sua vez estimula a quimiotaxia de monócitos e vários processos celulares associados à quimiotaxia, como o fluxo de Ca_{2+} e a expressão de integrinas. A MCP-1, em concentrações elevadas, induz a geração de espécies reativas de oxigênio (Rollins e cols, 1988).

O papel da resposta anti-inflamatória na malária ainda precisa ser melhor esclarecido, mas parece estar relacionado com a depuração dos parasitos durante as fases tardias da infecção primária.

Nas infecções secundárias, com resposta de anticorpos pelos linfócitos B, há um aumento de produção de IL-4 e IL-10 (Borges, 2013). Não houve modificação na capacidade para conter o crescimento do plasmódio em camundongos nocautes para o gene da IL-4 infectados com os *Plasmodium chabaudi* ou *Plasmodium berghei* ANKA (Saefel e cols, 2004), porém, o controle da infecção pelos camundongos BALB/c infectados pelo *P. berghei* ANKA foi viabilizado.

A IL-10 participa da resposta do sistema imunitário contra o plasmódio com papel anti-inflamatório regulando a resposta imune pela inibição da atividade de células auxiliares tipo 1 (T_H1), NK e macrófagos, que são estimulados durante a infecção (Couper e cols, 2008). Níveis elevados de IL-10 foram associados à maior parasitemia e desenvolvimento da anemia em crianças com o *P. falciparum* (May e cols, 2000; Huggoson e cols, 2004; Cabantous e cols, 2009; Boeuf e cols, 2012). Em contraste, em camundongos BALB/c infectados com o *P. berghei* ANKA, não susceptíveis à forma cerebral da doença, a supressão da IL-10 ocasionou o desenvolvimento da malária cerebral (de Kossodo e cols, 1997, Claser e cols, 2017) e correlacionou-se com níveis mais elevados de inflamação sistêmica e ativação de células T (Claser e cols, 2017). Ademais, níveis plasmáticos elevados de IL-10 e IFN- γ estão associados à proteção imunológica em crianças gabonesas com infecção assintomática por *P. falciparum* (Guiyedi e cols, 2015). Zhang e cols. (2012) mostraram que a IL-10 desempenha um papel importante no controle da resposta inflamatória evitando o dano tecidual e restabelecendo o equilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias.

1.6. Receptores para o FNT

O FNT- α representa o protótipo de uma superfamília de genes de moléculas ligantes que controlam as defesas do hospedeiro, inflamação, apoptose, autoimunidade e organogênese (Krönke e Adam-Klages, 2002; Randall e Engwerda, 2010; Brenner e cols, 2015). O FNT- α liga-se a três tipos de receptores, e todos (rFNT1/p55; rFNT2/p75 e rLTX) são co-expressos na maioria das células, mas diferem em sua expressão espontânea e induzida. Tem sido demonstrado que o receptor 1 para FNT (rFNT1) tem uma função principal na defesa contra infecções por patógenos intracelulares (Lucas e cols, 1997; Brenner e cols, 2015). O FNT- α exerce sua função pela interação tanto com o rFNT1 que contém o domínio de morte, como com o receptor 2 para o FNT (rFNT2), que não contém o domínio de morte (Wajant e Scheurich, 2001; Randall e Engwerda, 2010; Li e cols 2013; Brenner e cols, 2015). A linfotóxina (LT) interage com o rFNT-2 e com o receptor para LT- β (Randall e Engwerda, 2010).

Estudos em camundongos susceptíveis com malária cerebral mostraram expressão predominante do rFNT2, mas não do rFNT1, na microvasculatura cerebral, o que não ocorreu nos camundongos resistentes à forma cerebral da malária. Animais geneticamente modificados, de base genética B6 x 129, que é um híbrido gerado pelo acasalamento de uma fêmea C57BL/6J (B6) e um macho 129S1/SvImJ (129S), deficientes do rFNT2 foram significativamente protegidos da forma cerebral, enquanto os animais deficientes do rFNT1 foram tão susceptíveis à malária grave quanto os animais selvagens. Foi sugerido pelos autores que a proteção conferida pela ausência do rFNT2 deveu-se ao fato de não ter ocorrido aumento da expressão do ICAM-1 nos leucócitos, diminuindo desta maneira o seqüestro na microvasculatura cerebral (Lucas e cols, 1997). Tem sido observado que tanto a sinalização via rFNT2 quanto pelo receptor para linfotóxina- β são necessários e não redundantes para o desenvolvimento de patologia microvascular resultando em malária cerebral fatal, também avaliado utilizando camundongos de base genética C57BL/6 (Togbe e cols, 2008) e

que o bloqueio seletivo da sinalização via o receptor da linfotoxina LIGHT protegeu camundongos, nocaute para o gene LIGHT (B6.LIGHT^{-/-}), também de base genética C57BL/6, da malária cerebral experimental causada pelo *Plasmodium berghei* ANKA (Randall e cols, 2008).

Os fenômenos intracelulares que ocorrem após a ligação do FNT- α /LTX aos seus receptores FNT1 e 2 e receptor para linfotoxina são complexos e ainda pouco entendidos na malária. Muitas proteínas que são envolvidas nas vias de ativação intracelular após ligação do FNT- α ao seu receptor, que interagem direta ou indiretamente com o domínio citoplasmático dos receptores 1 e 2 do FNT (rFNT1 e rFNT2) e do rLT- β , mostram que estes receptores estão conectados com a via da apoptose e com a cascata de sinalização que leva à ativação do NF- κ B e JNK/MAPK (Wajant e Scheurich, 2001; Randall e Engwerda, 2010; Brenner e cols, 2015).

A sinalização através do receptor para o FNT- α ocorre por meio de duas classes de proteínas adaptadoras: os fatores associados ao receptor do FNT (TRAFs) e as moléculas domínio de morte (DD). Sete membros da família TRAF estão envolvidos na transdução de sinal. Os TRAF 1 e 2 estão envolvidas na transdução do sinal do FNT- α , IL-1, IL-17 e de alguns membros dos receptores semelhantes ao TOLL (Wajant e Scheurich, 2001; Oeckinghaus e cols 2011; Brenner e cols, 2015).

A proteína adaptadora é selecionada na dependência do receptor possuir o motivo que liga o TRAF ou o motivo que liga o DD (Krönke e Adam-Klages, 2002; Randall e Engwerda, 2010, Brenner, 2015). As proteínas adaptadoras TRAF1 e o TRAF2 foram os primeiros fatores associados ao receptor do FNT- α identificados. O TRAF 2 tem um papel importante em mediar a sinalização estimulada através do rFNT1, ativando a via do NF- κ B e JNK. Além disso, tem sido sugerido que o TRAF2 é um ponto de integração entre os sinais anti e pró-apoptóticos (Wajant e Scheurich, 2001; Brenner, 2015).

A sinalização pelo TRAF1 raramente resulta em apoptose, mas pode estimular muitas vias que levam à ativação celular, diferenciação, mas

também podem levar à apoptose. A ligação do FNT ao rFNT1 pode sinalizar através de várias moléculas que induzem respostas diferentes: 1) pela via FADD, que induz ativação da via das caspases; 2) através do MPAK/ERK, que ativa a via do NF- κ B; 3) pela via do NIK/IKK, que também ativa a via do NF- κ B, sendo que os dois últimos estimulam a inflamação, a produção de citocinas inflamatórias e a ativação celular (Krönke e Adam-Klages, 2002; Oeckinghaus e cols, 2011; Brenner e cols, 2015).

Estas proteínas adaptadoras permitem a flexibilização dos eventos de sinalização que parecem ser requeridos para determinar respostas específicas tão conflitantes como sinais de vida pela ativação celular ou sinais de morte pela apoptose (Krönke e Adam-Klages, 2002; Oeckinghaus e cols, 2011; Shih e cols, 2011; Brenner e cols, 2015).

Como o tipo de receptor para o FNT que é estimulado tem relação com a susceptibilidade ou resistência às formas graves da malária (Lucas e cols, 1997), e após ativação, vários caminhos intracelulares diferentes podem ocorrer, é possível que a susceptibilidade ou não às formas graves da doença possa depender da via de ativação que é estimulada predominantemente, entretanto estes aspectos ainda precisam ser esclarecidos na malária.

1.7. Vias de sinalização celular NF κ -B

O Fator nuclear kappa B (NF- κ B) é um conjunto de pequenas proteínas intimamente relacionadas que se ligam a um motivo comum conhecido como sítio κ B. Estes reguladores de transcrição compartilham um domínio terminal chamado domínio de homologia Rel. Este grupo de proteínas inclui as que precisam ou não de processamento proteolítico. As que não precisam são a RelA (p65), c-Rel e RelB. As que necessitam processamento proteolítico incluem o NF- κ B1 (p105) e o NF- κ B2 (p100), que produzem, após o processamento, a p50 e a p52. Membros destes dois grupos pareiam um com o outro, sendo que o NF- κ B mais frequentemente detectado é o heterodímero do p50 associado com o RelA (p65). O RelA é responsável pela principal atividade de transcrição pela presença de um forte domínio de ativação de

transcrição na sua porção C-terminal (Karin e cols, 2002; Shehata, 2005; Shih cols, 2011).

Diversos estímulos que induzem a ativação da via do NF- κ B, como citocinas (FNT, IL-1, IL-2, IL-6), a molécula glicofosfatidil inositol do plasmódio, o óxido nítrico e os radicais de oxigênio (Garg e Aggarwal, 2002; Shehata, 2005; Morgan e Liu, 2011) encontram-se aumentadas na infecção grave pelo plasmódio (Muniz-Junqueira e cols, 2005; Muniz-Junqueira 2007, Clark e cols, 2008). Esta produção aumentada leva à ativação da via do NF- κ B e termina num processo de retroalimentação positiva, agravando ainda mais o processo, pois aumentam ainda mais as mesmas moléculas que as induziram, e que estão envolvidas nos processos imunopatológicos da doença.

Em modelos experimentais, apenas a via canônica do NF- κ B é ativada na infecção pelo *P. berghei* ANKA no modelo C57BL/6 que apresenta a forma cerebral da malária, enquanto no modelo BALB/c, que não desenvolve a forma cerebral, tanto a via canônica quanto a não canônica são ativadas (Borges, 2013).

Múltiplos fatores poderiam estar envolvidos na determinação da ativação da via do NF- κ B, que vai levar à resposta celular, como o tipo de estímulo, o tipo celular, o receptor pelo qual a via foi ativada e as citocinas presentes no microambiente celular, desencadeando a morte celular programada (apoptose), adesão celular, proliferação, resposta imunitária inata e adaptativa, inflamação e resposta ao estresse celular (O'Dea e Hoffmann 2010; Perkins 2007; Yao, Xing e Boyce 2009). Estímulos inflamatórios, principalmente o FNT- α , ativa a via canônica ou clássica do NF- κ B, que leva à fosforilação do I κ B α na Ser32 e Ser36 ligando-se a ubiquitina, resultando numa degradação parcial da molécula pelo proteossoma 26S, culminando na translocação da molécula do NF- κ B para o núcleo, onde vai se ligar ao seu promotor (Perkins, 2007, Mitchell e cols, 2016). Uma modulação dessa via poderia amenizar a resposta inflamatória (Corazza, 2015), melhorando os sintomas das formas graves da doença.

A via não canônica ou via alternativa do NF κ -B é ativada principalmente por sinais de desenvolvimento através de receptores como rLT β e r2TNF (Perkins, 2007, Mitchell e cols, 2016), que induzido pela NIK, também conhecida como MAP3K14, através da estimulação do IKK α , leva o processamento de p100 em p52 pela fosforilação de p100 nas serinas 866 e 870, que se liga a ubiquitina, levando à degradação parcial da molécula e desencadeando sua translocação para o núcleo (Perkins, 2007, Mitchell e cols, 2016). A via não canônica do NF κ B controla uma variedade de fenótipos de desenvolvimento, incluindo a maturação e sobrevivência de células B, ativação de células dendríticas, e o metabolismo ósseo (Perkins, 2007; Mitchell e cols, 2016). A exposição em cultura de células de veia umbelical a hemácias parasitadas pelo *P. falciparum* induziu resposta inflamatória mediada pela ativação do NF- κ B. A inibição precoce desta via tem sido sugerida como uma aproximação para evitar as conseqüências proinflamatórias da ativação endotelial, e que a avaliação de métodos para modular a via do NF- κ B é uma meta a ser alcançada (Tripathi e cols, 2006; 2009).

Entretanto, fatores envolvidos na ativação ou não da via do NF- κ B precisam ainda ser esclarecidos na malária e qual ou quais vias são ativadas precisam ainda melhor esclarecimento na malária. Também não está esclarecido o possível papel de potenciais drogas imunomoduladoras sobre a ativação do NF κ B nas formas graves da malária.

1.8. Corpúsculos Lipídicos

Corpúsculos lipídicos ou gotículas lipídicas são organelas ricas em lipídios existentes em células de quase todos os organismos, incluindo plantas, leveduras, animais. Os lipídeos têm sido reconhecidos como moléculas sinalizadoras de vias intracelulares e têm a capacidade de desencadear respostas fisiológicas importantes. Essas organelas estão aumentadas em células como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células endoteliais presentes nos processos inflamatórios (Bozza e cols, 2009). Sua

estrutura é composta por uma monocamada de fosfolipídios e seu núcleo é rico em lipídios neutros. Foi demonstrado seu envolvimento na produção de proteínas associadas ao metabolismo do colesterol e triglicerídeos, no transporte do araquidonato e dos ácidos graxos para membrana, ademais esta implicado na regulação e formação dos eicosanóides, no armazenamento de citocinas, como o FNT- α , e quimiocinas, como a Rantes, e na ativação das vias de sinalização intracelular (Bozza e Bandeira-Melo, 2005; Wan e cols, 2007; Bozza e cols, 2009).

Os corpúsculos lipídicos são as principais organelas produtoras de eicosanóides, participam da sinalização intracelular e sua expressão está aumentada em células envolvidas no processo inflamatório (Melo e Dvorak, 2012). Apresentam funções inflamatórias e imunorregulatórias, dado que contêm enzimas formadoras de eicosanóides, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (Borges, 2017). Os eicosanóides, incluindo prostanóides, leucotrienos e lipoxinas, são moléculas sinalizadoras derivadas da oxigenação enzimática do ácido araquidônico e controlam processos intracelulares importantes, incluindo ativação celular, metabolismo, migração, proliferação e morte. Estes lipídios participam de processos como homeostasia tissular, defesa do hospedeiro e inflamação (Wymann e Schneider, 2008). A síntese dos eicosanóides começa com a liberação do ácido araquidônico dos fosfolipídeos de membrana pela ação da fosfolipase A2 e pode ocorrer em vários locais, como na membrana nuclear, na membrana fagossomal, no retículo endoplasmático e em corpúsculos lipídicos. A síntese dos prostanóides começa com a ação das enzimas ciclooxigenase (COX) que determinará a produção de prostaglandinas ou tromboxane e das lipoxigenases, sendo que a 5LO determinará a produção dos leucotrienos e a 15LO, da eoxina (Bozza e cols 2011). Foi observado acúmulo de corpúsculos lipídicos na aterosclerose, septicemia bacteriana, síndrome da angústia respiratória aguda, inflamação pulmonar alérgica, artrite, infecções por micobactéria e na malária (McGookey e cols, 1983; Leite e cols, 2005; Mesquita-Santos, 2006; Salluh e cols, 2007; Bozza e cols, 2009; Melo e Dvorak, 2012; Couto, 2015; Borges e cols, 2017).

Quanto às infecções por protozoários, foi observado acúmulo de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais na infecção murina por *Leishmania amazonensis* (Pinheiro e cols, 2009), nos fibroblastos na toxoplasmose humana (Charron e cols, 2002), nos macrófagos peritoneais e cardíacos de camundongos e ratos infectados com o *Trypanosoma cruzi* (Melo e cols, 2003; D'ávila e cols, 2011), em eosinófilos na esquistossomose murina (Magalhães e cols, 2010) e *Leishmania infantum* (Rodríguez e cols, 2017). Na malária, foi visto em eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum* (Palacpac e cols, 2004; Jackson, 2004), em monócitos humanos estimulados *in vitro* com o *P. falciparum* (Couto, 2015) e em macrófagos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (Borges e cols, 2017). Esse aumento sugere uma condição inflamatória tanto em cepas de camundongos resistentes, quanto susceptíveis à malária cerebral, porém, houve diferenças entre as enzimas produzidas dentro dos corpos lipídicos, evidenciadas pelos diferentes níveis de expressão de COX-2 e 5-LOX entre as três linhagens. Enquanto os camundongos CBA exibiram maior expressão de COX-2, os camundongos C57BL/6 exibiram níveis aumentados de COX-2 e 5-LOX nos vasos cerebrais (Borges e cols, 2017). Já foi demonstrado em camundongos ICR infectados pelo *P. berghei* ANKA maior mortalidade dos animais tratados com aspirina, que é um inibidor da COX, sugerindo que as prostaglandinas estariam relacionadas com a proteção contra a malária, enquanto os leucotrienos seriam detrimenais (Xiao e cols, 1999) e acúmulo de COX1 e COX2 já foi observado por imunohistoquímica em cérebros de pacientes que morreram de malária cerebral (Deininger e cols, 2000).

As duas vias do NF- κ B e dos eicosanóides terminam com a produção de radicais livres e são por sua vez moduladas pelos radicais livres. Como também o PPAR γ , que é modulado pelo FNT- α (Ye, 2008), é um modulador do metabolismo lipídico (Bozza e cols 2011), mostrando a complexidade das interações entre as várias vias intracelulares (Morgan e Liu, 2011). Observamos que o tratamento *in vitro* dos eritrócitos infectados com *P.*

falciparum e dos monócitos por 60 min com três antimaláricos, artemeter, lumefantrina ou mefloquina, diminuiu a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos, quando o estímulo foi feito com o parasito não sensibilizado, cuja ingestão pelo monócito ocorreu pelos receptores para padrões moleculares de patógenos. Entretanto, para a lumefantrina e para a mefloquina, observamos resultado oposto quando o estímulo foi feito com os eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* sensibilizado com soro fresco, ocorrendo aumento da expressão dos corpúsculos lipídicos após o estímulo. Nesse último caso, a ingestão do parasito ocorreu pelos receptores para opsoninas. Essa diferença nas respostas indica que em nosso modelo a expressão dos corpúsculos lipídicos foi dependente da via pelo qual o monócito foi estimulado pelo eritrócito parasitado (Couto, 2015).

É suposto que no cérebro as oscilações do metabolismo lipídico possam estar relacionadas a várias desordens e alterações neurológicas (Borges, 2013). Múltiplas doenças cerebrais estão associadas com baixas concentrações de produtos lipídicos que influenciam na biossíntese de neurotransmissores amplificando a peroxidação lipídica (Harada e cols, 2007). A malária cerebral em camundongos C57BL/6, infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, mostrou correlação com as alterações do metabolismo lipídico (Ghosh e cols, 2012). Os corpos lipídicos são reguladores críticos de diferentes doenças inflamatórias, marcadores chave de ativação de leucócitos e alvos atraentes para novas terapias anti-inflamatórias (Bozza, 2009).

1.9. Óxido Nítrico

O óxido nítrico participa de várias funções biológicas intra e extracelulares (Brunet, 2001; Borges 2013), é produzido por várias células como, macrófagos/micróglia, células endoteliais e outras células do sistema imunitário por meio da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Hu e cols, 2016, Percário e cols, 2012, Cascaes, 2017). O NO é uma molécula mensageira inter e intracelular que participa da defesa contra o plasmódio, impedindo ou limitando seu crescimento, agindo diretamente nas células regulando a

resposta inflamatória e estimulando a fagocitose por macrófagos (Brunet, 2001; Borges 2006).

O papel do óxido nítrico na malária ainda não está totalmente compreendido. O desequilíbrio na produção de citocinas inflamatórias e a alteração do metabolismo lipídico promovem a formação de várias espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) (Morgan e Liu, 2011; Borges 2013). A produção local de citocinas proinflamatórias pelos monócitos, macrófagos e micróglia ativados, particularmente pelo FNT- α e linfotóxina, e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, leva à ativação das células endoteliais e, eventualmente, ao dano destas células e das células vizinhas (Schofield e Grau, 2005). Após ativação, as células endoteliais aumentam a produção de óxido nítrico e a expressão de moléculas de aderência, as quais agravam ainda mais o sequestro dos eritrócitos parasitados (Turner, 1997; Tosta e Muniz-Junqueira, 2006; 2009; Muniz-Junqueira, 2007; Muniz-Junqueira e Tosta, 2007; Mishra e cols, 2007; Mishra e Newton, 2009; Tosta e Muniz-Junqueira, 2011; Razakandrainibe e cols, 2013; Muniz-Junqueira e cols, 2021). Além disso, o NO tem ação moduladora sobre a transmissão de sinal na sinapse neuronal (Mendis e Carter, 1995), como também pode ocasionar lesão tecidual mais grave pela formação de peroxinitritos (Tosta e Muniz-Junqueira, 2011; Cascaes, 2017; Muniz-Junqueira e cols, 2021). Para Sobolewski e cols (2005a), o óxido nítrico pode participar da patogenia das formas graves da malária. Ademais, outros autores demonstraram que o NO possui um efeito antiparasitário contra o plasmódio (Rockett e cols, 1988; Stevenson e cols, 1992; Taylor-Robinson, 1997; Taylor-Robinson e Looker, 1998; Taylor-Robinson e Smith, 1999). A inibição do NO levou ao desenvolvimento das formas graves da malária em camundongos Swiss infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA (Percário e cols, 2012).

1.10. Imunomodulação terapêutica e papel da pentoxifilina

A pentoxifilina [1-(5-oxohexil)-3,7-dimetilxantina] é um derivado da xantina. O mecanismo pelo qual a pentoxifilina (PTX) atua não é bem conhecido, mas parece estar relacionado às concentrações de trifosfato de adenosina eritrocitária (ATP) e à fosforilação das proteínas da membrana eritrocitária, ambos os mecanismos resultando em uma melhora na flexibilidade eritrocitária (Zakeri-Milani e cols, 2012) e na redução da viscosidade do sangue (Beermann e cols, 1985; Smith e cols, 1986). A Ptx é altamente solúvel em água e é bem absorvida pelo trato gastrointestinal, no entanto, a quantidade de droga biodisponível para o corpo é apenas cerca de 20-30% devido ao extenso metabolismo hepático de primeira passagem (Beermann e cols, 1985; Smith e cols, 1986; Varshosaze cols, 2010; Zakeri-Milani e cols, 2012). Após a dosagem oral a pentoxifilina é extensamente metabolizada. Um dos principais metabólitos no plasma é o 1- (S'-hidroxihexil) 3,7-dimetilxantina, enquanto os dois principais metabólitos urinários são 1-carboxipropil-7-dimetilxantina e 1 carboxibutil-3,7-dimetilxantina.

Em humano as concentrações plasmáticas máximas de pentoxifilina e metabólitos de cerca de 300 e 343 µg/L foram alcançados em 3,3 e 3,2 horas, respectivamente e a meia-vida foi de aproximadamente 1 a 2 h (Beermann e cols, 1985; Smith e cols, 1986; Varshosaze cols, 2010; Zakeri-Milani e cols, 2012). Outros metabólitos reconhecidos têm concentrações plasmáticas mais baixas e menos ou nenhuma atividade conhecida (Beermann e cols, 1985; Smith e cols, 1986). Em camundongos, a administração oral de pentoxifilina na dose de 50 mg/kg/dia levou a concentração plasmática máxima 4260 µg/L, em tempo máximo de 10 min e meia vida de 10 min (Wyska e col, 2007) e a administração intraperitoneal da pentoxifilina na dose de 100 mg/kg/dia levou a concentração máxima de 1×10^5 µg/L, em tempo máximo de 5 min e meia vida de 7 min (Honess e col, 1993).

A pentoxifilina é completamente metabolizada e mais de 90% é eliminada por via urinária sob a forma de metabólitos polares hidrossolúveis

não conjugados. Entretanto, no caso dos comprimidos de liberação prolongada de Ptx, a extensão total da absorção também é aumentada pela co-administração do medicamento às refeições (Beermann e cols, 1985; Smith e cols, 1986).

As formas de dosagem oral são compostas pela substância medicamentosa e excipientes. Um teste de dissolução comparativo in vitro foi realizado comparando duas formulações de comprimidos de pentoxifilina de liberação prolongada oral (400 mg) seguindo a orientação de bioequivalência da agência reguladora norte-americana, a *Food and Drug Administration* (FDA), e ambas atenderam às especificações farmacêuticas gerais para variação de peso, ensaio de conteúdo e teste de uniformidade de conteúdo. Ambos os produtos liberaram até 30% na primeira hora e não menos que 80% em 20 h e passaram no padrão USP para teste de dissolução de comprimidos de liberação prolongada de Ptx (Zakeri-Milani e cols, 2012). Os comprimidos de pentoxifilina para administração oral contêm 400 mg da droga ativa revestido de liberação prolongada com os seguintes ingredientes inativos: povidona, hipromelose, celulose microcristalina, estearato de magnésio, álcool polivinílico + dióxido de titânio + macrogol + talco, corante laca vermelho eritrosina.

A pentoxifilina é indicada em doenças oclusivas arteriais periféricas e distúrbios artério-venosos de natureza aterosclerótica ou diabética (claudicação intermitente, dor em repouso) e distúrbios tróficos (úlceras nas pernas e gangrena); alterações circulatórias cerebrais (sequelas de arteriosclerose cerebral, como: dificuldade na concentração, vertigem e comprometimento da memória), estados isquêmicos e pós-apopléticos; distúrbios circulatórios do olho ou ouvido interno, associados a processos vasculares degenerativos e a comprometimento da visão ou audição.

A pentoxifilina como terapêutica auxiliar para malária não foi indicada pela OMS para o tratamento da malária devido aos resultados conflitantes dos trabalhos que utilizaram essa terapêutica em modelos experimentais e seres humanos. Apesar da pleora de seus efeitos potencialmente benéficos, os resultados das tentativas de sua utilização como terapêutica adjuvante tanto

na malária humana, quanto na experimental são ainda controversos (Muniz-Junqueira, 2007; Muniz-Junqueira e Tosta, 2007). Uma característica comum das formas graves da malária é a descontrolada ativação do sistema imunitário e a Ptx poderia modular muitos pontos responsáveis pela ativação do sistema imunitário. Portanto, a adoção de terapêuticas capazes de controlar esta inadequada resposta imune seria benéfica, no sentido de reduzir a gravidade das manifestações clínico-patológicas e melhorar o prognóstico dos pacientes.

O notável maior entendimento da patogênese da doença tem encorajado potenciais intervenções terapêuticas esperando modular a hiperativação do sistema imunitário. Porém, embora uma possibilidade esperançosa em bases teóricas, um sucesso definitivo está longe de ser alcançado pelas avaliações clínicas já realizadas (Muniz-Junqueira, 2007; Muniz-Junqueira e Tosta, 2007). Muitas aproximações têm sido tentadas: a) utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais anti-citocinas pró-inflamatórias excessivamente produzidas durante a infecção, b) anticorpos contra moléculas de aderência ou plaquetas para diminuir o seqüestro de eritrócitos parasitados na microcirculação e para melhorar o fluxo sanguíneo, c) drogas que diminuem o efeito de radicais de oxigênio, e) drogas com ação pleiotrópica sobre os aspectos principais da imunopatogenese das formas graves (Muniz-Junqueira e cols 2005; Muniz-Junqueira, 2007; Muniz-Junqueira e Tosta, 2007; Balachandar e Katyal, 2011).

A pentoxifilina (Ptx) é a droga com ação moduladora pleiotrópica sobre o sistema imunitário que tem sido mais avaliada na malária experimental e humana e atua em muitos pontos importantes da patogênese das formas graves. Seus efeitos potencialmente benéficos são: a) melhorar o fluxo sanguíneo cerebral, b) melhorar a microcirculação por seu efeito hemoreológico, c) aumentar a deformabilidade dos eritrócitos, d) reduzir a viscosidade sanguínea, e) diminuir a agregabilidade das plaquetas, f) ter efeito anti-inflamatório por inibir a produção de citocinas inflamatórias e radicais livres, g) ter propriedades protetoras do endotélio e h) inibir a formação de roseta pelas hemácias parasitadas pelo plasmódio e desfazer as rosetas já

formadas (Ward e Clissold, 1987; Doherty e cols, 1991; Crouch e Fletcher, 1992; Neuner e cols, 1994; Mandell, 1995; Lehman e cols, 1997; Kriska e cols, 1998).

Têm sido mostrados resultados positivos, como a diminuição dos níveis séricos do FNT- α (Graninger e cols, 1991; Di Perri e cols, 1995), prevenção da malária cerebral (Kremsner e cols, 1991), aumento da sobrevivência em camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA (Santos-Neto e cols, 1991; de Paula Júnior, 2003; Borges, 2006), prevenção de dano seletivo dos neurônios do hipocampo em camundongo C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* K173 (Stoltenburg-Didinger, 1993), e diminuição da necrose de neurônios no córtex cerebral no modelo CBA (Corazza, 2015). Além disso, a administração de pentoxifilina em crianças (Di Perri e cols, 1995) e adultos (Das e cols, 2003) com malária cerebral causou um efeito inibitório na síntese de FNT- α , significativamente encurtando a duração do coma e diminuindo a mortalidade.

Entretanto, Looareesuwan e cols (1998) não observaram nenhuma diferença nos níveis séricos de FNT- α ou na evolução clínica entre indivíduos tratados ou não com a pentoxifilina, porém, a heterogeneidade das apresentações clínicas dos pacientes avaliados e o pequeno tamanho dos grupos amostrais ainda não permitiram conclusões definitivas. Por outro lado, Wenisch e cols (1998) mostraram que a utilização de altas doses de pentoxifilina marcadamente reduziu os níveis séricos do FNT- α , IL-6 e receptor solúvel para o FNT- α quando comparado aos pacientes que receberam doses mais baixas do fármaco ou placebo. Porém, nenhuma conclusão foi possível ser tirada dos efeitos da droga sobre o curso clínico da malária. Hemmer e cols (1997) não observaram nenhuma diferença no tempo de hospitalização, tempo de desaparecimento da febre, consumo total de acetaminofeno e parâmetros laboratoriais entre os grupos tratados ou não com a pentoxifilina, além da presença de efeitos colaterais como náuseas e desconforto abdominal mais frequentemente no grupo tratado com o fármaco.

E Lell e cols (2010) mostraram maior mortalidade no grupo de crianças com malária cerebral tratadas com a pentoxifilina.

Tem sido mostrado que a infecção pelo *P. berghei* Anka determinou alterações histopatológicas diferentes em modelos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou resistentes à malária cerebral (BALB/c), indicando que a resposta a infecção nesses modelos é diferente. O tratamento dos animais com a pentoxifilina protegeu da necrose neuronal e congestão vascular no CBA, mas agravou no C57BL/6. Diferentemente, diminuiu a aderência de eritrócitos e leucócitos nos camundongos C57BL/6, mas não no CBA (Corazza, 2015). As lesões intra-alveolares pulmonares determinadas pelo aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar foram observadas nos três modelos infectados com o plasmódio, embora discreta no BALB/c, que não apresenta a forma grave cerebral ou pulmonar, e a pentoxifilina aboliu a lesão alveolar focal nos três modelos da malária. Como também diminuiu a congestão nos vasos pulmonares (Corazza, 2015).

Por que ocorre esta discordância entre os possíveis benefícios esperados da pentoxifilina na malária, teoricamente capazes de influenciar pontos chaves da imunopatogenia da doença, e as observações clínicas já relatadas? Alguns pontos podem ser considerados: os pacientes estudados representavam grupos muito heterogêneos, com quadros clínicos diversos, os critérios de gravidade nem sempre foram observados ou estabelecidos, os esquemas terapêuticos foram muito variáveis e o tamanho das amostras nem sempre foram suficientes para se tirar conclusões (Muniz-Junqueira e Tosta, 2007). Além desses, alguns outros aspectos precisam ser considerados para que a droga possa ser efetiva, como: o início do tratamento deve ser precoce o suficiente para modular negativamente o sistema imunitário antes do aparecimento das lesões, porém, não pode ser tão precoce que iniba a resposta de defesa do próprio indivíduo.

Entretanto, além de testes clínicos melhor conduzidos com desenhos experimentais mais bem definidos, é importante ter-se uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais a pentoxifilina modula as respostas do sistema imunitário, o que a tornaria de aplicação terapêutica

mais eficiente como adjuvante no tratamento da malária grave. Foram observados efeitos diferentes nas alterações histopatológicas pelo tratamento com a pentoxifilina nos três modelos da malária, BALB/c, CBA e C57BL/6 (Corazza, 2015), portanto, a melhor compreensão dos mecanismos de imunopatogênese na malária e o efeito da pentoxifilina na doença poderá contribuir para compreensão dos resultados controversos encontrados em seres humanos tratados com a pentoxifilina.

Já foi visto que o perfil de resposta imunológica na malária é diferente nos três modelos estudados. Ademais, há discordância quanto aos possíveis benefícios esperados pela utilização da pentoxifilina na malária. Neste trabalho, estudamos a influência da droga imunomoduladora pentoxifilina, nos três modelos de camundongos, BALB/c, CBA e C57BL/6, no intuito de avaliar o efeito da pentoxifilina nos aspectos funcionais do sistema imunitário relacionados com as alterações das vias moleculares que ocorrem na intimidade das células para verificar se são diferente nos três modelos, observar a influência da Ptx na ativação dessas vias nos animais que são resistentes à malária cerebral em comparação com aqueles que apresentam a forma cerebral da doença. Dessa forma esperamos compreender os possíveis efeitos da pentoxifilina nos três modelos e contribuir para uma terapêutica mais adequada, no sentido de reduzir a gravidade das manifestações clínico-patológicas e melhorar o prognóstico dos pacientes.

A pentoxifilina modulou negativamente ativação de duas vias de sinalização pró-inflamatórias principais (NF- κ B e JAK-STAT) por meio do efeito antagonista na ligação da adenosina com seu receptor (A2AAR). O desencadeamento de A2AAR causa elevação dos níveis de cAMP intracelular. Isso leva ao aumento da atividade da SUMO-1 junto com a inibição do complexo E3 SCF Ub ligase, que impede a ubiquitinação e degradação de I κ B α , desligando assim a via do NF- κ B. Além disso, altos níveis de cAMP suprimem a sinalização JAK / STAT mediada por citocinas por meio da indução da proteína inibidora SOCS3 (Feret e cols, 2021).

Como a pentoxifilina modula a produção de citocinas inflamatórias, que utilizam a via do NF- κ B, que pode resultar em respostas variáveis, torna-se importante esclarecer por quais vias intracelulares o fármaco está exercendo seu efeito, o que não está ainda esclarecido na malária.

Apesar da falta de dados definitivos sobre o uso de drogas imunomoduladoras na malária, como seus mecanismos de patogênese são múltiplos e complexos, é provável que fármacos com ação pleiotrópica sobre o sistema imunitário tenham mais chance de sucesso como adjuvantes da terapia antimicrobiana na malária, particularmente aqueles que modulam simultaneamente os mecanismos principais envolvidos na patogênese da doença. Assim, é importante esclarecer os aspectos funcionais do sistema imunitário relacionados com as alterações nos mecanismos celulares e moleculares que ocorrem na intimidade das células do sistema imunitário na malária. Como também avaliar qual é a influência da droga imunomoduladora pentoxifilina sobre as células do sistema imunitário durante a infecção malárica, utilizando modelos susceptíveis ou não às formas graves da doença.

A melhor compreensão da via do NF- κ B poderá repercutir no esclarecimento dos mecanismos celulares e moleculares que determinam as diferentes formas e gravidade da doença, esclarecendo os mecanismos patogênicos intrínsecos moleculares que estão ocorrendo na intimidade da célula, mas que podem repercutir diretamente nas diversas expressões clínicas da doença. Ademais, o entendimento destes mecanismos poderá resultar numa melhor compreensão dos mecanismos de modulação das respostas do sistema imunitário por estes fármacos, dando subsídios para propiciar uma utilização clínica mais adequada das drogas imunomoduladoras.

JUSTIFICATIVA

O FNT- α é uma das principais citocinas inflamatórias que participa dos mecanismos fisiopatogênicos da malária grave e a pentoxifilina modula a resposta inflamatória, e a produção do FNT- α . A ativação das vias do NF- κ B pode culminar na produção de citocinas inflamatórias, particularmente o FNT- α , dependendo de sua via de ativação. O NF- κ B poderia ser ativado por vias diferentes em modelos experimentais susceptíveis ou resistentes à forma cerebral da malária. A hiperativação da via da resposta inflamatória pode levar à malária grave. A ativação da via do NF- κ B ocorre pela estimulação dos receptores para padrões moleculares de patógenos na fase inicial da infecção, entretanto, é possível que sua ativação pode ser mantida pela ação das citocinas inflamatórias, particularmente o FNT- α , ligando-se aos seus receptores e amplificando a produção das moléculas da resposta inflamatórias. Há três receptores para o FNT- α que poderiam ser estimulados, o receptor 1 FNT α (r1FNT), o receptor 2 para o FNT- α (r2FNT) e o receptor para linfotóxina (rLTX). Portanto, a melhor compreensão das vias de ativação do NF- κ B desde os receptores para o FNT até a ativação das moléculas finais da via, e a produção das citocinas e da ação da pentoxifilina nessas vias de ativação poderá contribuir para o melhor entendimento do desenvolvimento das formas graves da malária e aumentará a possibilidade de utilização de drogas imunomoduladoras, como a pentoxifilina, de modo mais adequado, como adjuvante aos antiparasitários, contribuindo para aumentar o arsenal terapêutico no tratamento da malária e diminuindo a ainda inaceitavelmente alta morbi-mortalidade pela doença.

OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar se há diferenças nas vias intracelulares do NF- κ B que são utilizadas em modelos susceptíveis ou resistentes à forma cerebral da malária e a influência da droga imunomoduladora pentoxifilina na evolução da malária e nas vias de ativação do NF- κ B nos camundongos BALB/c, resistentes à malária cerebral e nos camundongos CBA e C57BL/6, susceptíveis a forma cerebral da doença, quando infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a resposta à infecção pelo plasmódio e a influência da pentoxifilina:

- 1) na sobrevivência, na evolução do peso, na anemia, na parasitemia e na produção de corpúsculos lipídicos e óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos animais nos três modelos de estudo.
- 2) na produção de citocinas no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais, no homogenato do tecido cerebral e no soro dos animais dos três modelos de estudo.
- 3) na expressão dos receptores 1 e 2 para o FNT e do receptor para linfotoxina e de moléculas das vias de ativação do NF- κ B em micróglia e em outras células do tecido cerebral.
- 4) na expressão das moléculas finais das vias canônica e não canônica do NF- κ B em micróglia e em outras células do tecido cerebral.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Na Figura 1 encontra-se esquematizado o desenho experimental do trabalho. Para analisar a influência do tratamento com pentoxifilina (Ptx) nos três modelos foram avaliados a sobrevivência dos animais, parasitemia, hematócrito e peso, a expressão de corpúsculos lipídicos, a produção de NO e de citocinas, a expressão do receptor para linfotóxina e dos receptores 1 e 2 para o fator de necrose tumoral- α e as vias canônicas e não canônicas do NF κ B.

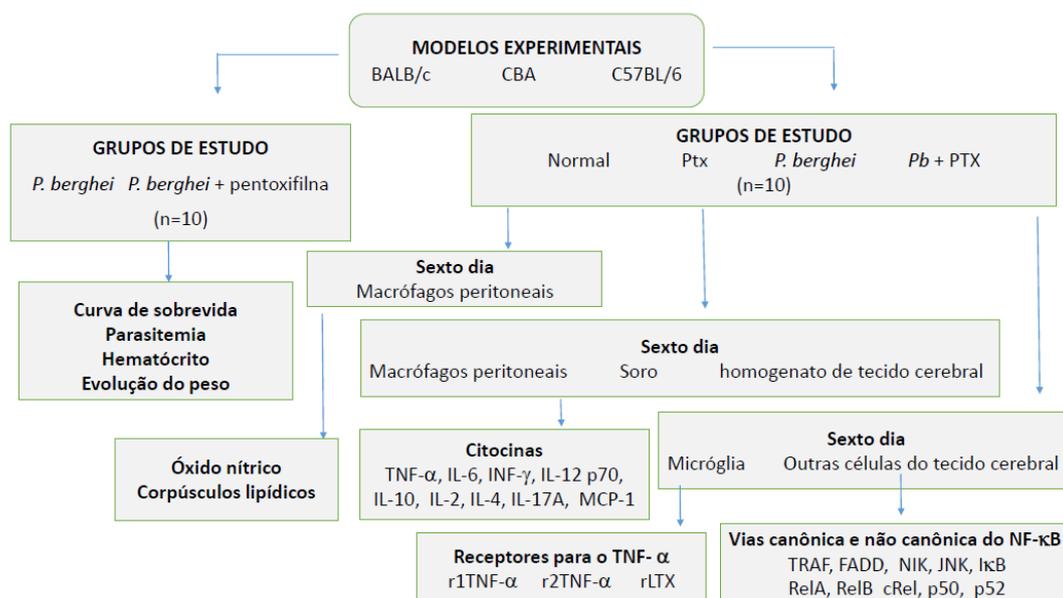


Figura – 01. Desenho experimental

4.2. Tipo de estudo e aspectos éticos

Estudo experimental realizado no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Foram estudados macrófagos peritoneais e micróglia de camundongos, homogenato do tecido cerebral e soro da linhagem BALB/c, modelo não susceptível à malária cerebral, e animais das linhagens C57BL/6 e CBA, modelos que são susceptíveis à malária cerebral. Os camundongos foram infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA.

O presente projeto obedeceu às normas éticas para pesquisa científica com animais de experimentação e foi desenvolvido com total isenção de quaisquer conflitos de interesse e sem qualquer relação com os laboratório fornecedor da pentoxifilina e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade de Brasília (Processos: 43050/2010 e 006/2020). Foram obedecidas as diretrizes do “ARRIVE” do *National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research* (NC3Rs).

4.3. Animais

Os animais foram provenientes do alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e do biotério da UNICAMP (CEMIB / UNICAMP).

Nos animais obtidos do alojamento de animais da Faculdade de Medicina da UnB foram avaliados a sobrevivência dos animais, parasitemia, hematócrito, peso, a expressão de corpúsculos lipídicos, a produção de NO e a determinação das citocinas. Os animais provenientes do biotério da UNICAMP eram livres de patógenos, entretanto, ficaram mais de um mês em nosso alojamento nas mesmas condições que os outros animais utilizados em nossos experimentos, e esses foram utilizados nos experimentos que analisaram da via do NF- κ B.

A média de idade de todos os animais utilizados em nossos experimentos dos três modelos foram:

BALB/c: Grupo controle = $8,2 \pm 0,6$ semanas; Grupo tratado inoculado com salina e tratado com pentoxifilina (Ptx) = $8,1 \pm 0,5$ semanas; Grupo infectado com o *Plasmodium berghei* ANKA e tratado com salina (Pb) = $8 \pm 0,0$ semanas; Grupo infectado com o *Plasmodium berghei* ANKA e tratado com pentoxifilina (Pb+Ptx) = $8 \pm 0,0$ semanas.

CBA: Controle = $8,1 \pm 0,7$ semanas; Ptx = $7,9 \pm 0,7$ semanas; Pb = $7,9 \pm 0,7$ semanas; Pb+Ptx = $8 \pm 0,6$ semanas.

C57BL/6: Controle = $7,9 \pm 0,5$ semanas; Ptx = $8,4 \pm 0,8$ semanas; Pb = $7,9 \pm 0,0$ semanas; Pb+Ptx = $8,6 \pm 0,8$ semanas.

Os camundongos eram mantidos em caixas em grupos de no máximo 4 animais, em estante ventilada, com ciclo de 12h no claro e 12 h no escuro e a eutanásia foi realizada em câmara de CO₂ dos animais previamente anestesiados por via intraperitoneal, com 75mg/kg de Cetamin (Cloritado de Cetamina) e 10mg/kg de Xilazin (Cloridato de xilazina 2%) (Sintec do Brasil Ltda).

Para os animais em que foi analisada a sobrevida, a morte dos animais foi espontânea para não interferir nos resultados.

4.3.1. Grupos do estudo

4.3.1.1. Curva de sobrevida

Para avaliar a curva de sobrevida, os animais foram separados em dois grupos (10 animais por grupo), para cada um dos três modelos de camundongos BALB/c, CBA, C57BL/6:

- 1) grupo infectado com *P. berghei* ANKA e tratado com salina 0,9% (Pb);
- 2) grupo infectado com *P. berghei* ANKA e tratado com pentoxifilina 100 mg/kg/dia por via oral (Pb+Ptx).

O tratamento com a Ptx foi feito por via oral utilizando pipeta e ponteira e começou no terceiro dia da infecção (Muniz-Junqueira e cols, 2001). Para avaliarmos a influência do tratamento com a pentoxifilina na sobrevida, os animais foram acompanhados até a morte espontânea. Nesses animais avaliamos o peso, hematócrito e a parasitemia, no terceiro e quinto dia, nos três modelos e no oitavo, décimo quinto e vigésimo primeiro dia no modelo BALB/c.

4.3.1.2. Grupos de estudo para avaliação das funções do sistema imunitário

Para avaliar a expressão dos corpúsculos lipídicos, produção de óxido nítrico, determinação das citocinas e análise da via do NF- κ B os animais foram separados em quatro grupos:

- 1) grupo controle tratado com salina 0,9% (Controle);
- 2) grupo tratado com pentoxifilina 100 mg/kg/dia por via oral (Ptx);
- 3) grupo infectado com *P. berghei* ANKA e tratado com salina 0,9% (Pb) ;
- 4) grupo infectado com *P. berghei* ANKA e tratado com pentoxifilina, 100 mg/kg/dia, por via oral (Pb+Ptx). O tratamento com a Ptx foi feito por via oral utilizando pipeta e ponteira começou no terceiro dia da infecção (Muniz-Junqueira e cols, 2001).

4.4. Inóculo

A cepa do *Plasmodium berghei* ANKA utilizada foi proveniente do Laboratório de Malária do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília. Para o inóculo, os parasitos eram previamente descongelados e feitas passagens em camundongos Swiss para recuperar a virulência da cepa. Os camundongos eram inoculados com 10^6 eritrócitos parasitados em solução salina tamponada com fosfato, pH 7.2, estéril, num volume final de 100 μ l, por via intraperitoneal. Os animais de passagens eram acompanhados e quando a parasitemia estava entre 10 a 20%, retirava-se o sangue por punção cardíaca para fazer o inóculo dos animais do estudo. A quantificação dos eritrócitos era realizada em câmara de Neubauer e a parasitemia era determinada ao microscópio óptico em 500 eritrócitos.

4.5. Tratamento com a Pentoxifilina

Utilizou-se a pentoxifilina 400mg (EMS, S/A), por via oral. O comprimido era macerado e diluído em salina, sendo que cada animal recebeu 100 mg/kg/dia em duas doses (50mg/dose) em 40 μ L, de 12/12 horas (Massart e cols, 2012; Perelló e cols, 2016). O tratamento por via oral foi feito utilizando

pipeta e ponteira e oferecido delicadamente na boca dos animais, que sugavam espontaneamente o medicamento. O comprimido de pentoxifilina era masserado todos os dias pela manhã e diluído em salina 0,9% em temperatura ambiente, sendo utilizado até no máximo 12 horas após a diluição.

4.6. Procedimento para coleta do cérebro

Após os animais serem anestesiados e eutanasiados os cérebros eram perfundidos com solução de STF, com 1% de EDTA, pH 7,2, 0,15 M, removidos e transferidos para uma placa de vidro estéril onde era lavado com STF, pH 7,2, 0,15 M, estéril, pesados e cortado com o auxílio de um bisturi em pequenas partes. Em todos os camundongos infectados, a parasitemia foi avaliada após a eutanásia para garantir que estavam infectados.

4.6.1. Preparação do homogenato do cérebro

Os cérebros que foram retirados como acima descrito, dos quatro grupos dos três modelos BALB/c, CBA e C57BL/6, foram macerados com auxílio de um pistilo em um cadinho contendo 4 mL de RPMI 1640, pH 7,2, acrescido de Hepes 20mM e glutamina 2mM. O lisado foi centrifugado por 20 min a 700 g e o sobrenadante obtido de cada amostra individualmente foi mantido a -80°C até a realização das determinações das citocinas (Borges, 2013).

4.6.2. Obtenção da micróglia e outras células do tecido cerebral

Os cérebros foram retirados como acima descrito, dos quatro grupos dos três modelos BALB/c, CBA e C57BL/6 e as microglias e as células cerebrais foram obtidas de acordo com o método descrito por Cardona e cols (2006), com adaptações. Os cérebros foram agitados por 20 min em uma

solução de digestão (9,54 mL de solução balanceada de Hanks (HBSS), (SIGMA), 50 µL de colagenase D (SIGMA), 10%, 10 µL de 100 mg / ml de n-a-tosyl-l-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK) (SIGMA). A reação enzimática foi então extinta pela adição de 10 ml de HBSS com 10% de soro fetal bovino (Gibco). Os homogenatos foram filtrados em um filtro de 70 µm (tipo Falcon, BD) e as suspensões celulares resultantes foram centrifugadas a 300 × g por 7 min, a 18° três vezes. As células resultantes foram ressuspensas em 2 mL de HBSS, quantificadas em hematocítmetro e a viabilidade, que foi avaliada pela exclusão da nigrosina, sempre ultrapassou 95%. Esse método de obtenção das micróglia de animais, é bem estabelecido, entretanto, obtêm-se uma população de células cerebrais enriquecida de micróglia, mas apresenta junto também outras células do tecido cerebral . As células de micróglia foram melhor caracterizadas dessa população nas análises por citometria de fluxo pelo marcador primário específico para micróglia anti-F4/80 (F4/80 Anticorpo (M-300): sc-25830, Santa Cruz Biotechnology) e o anticorpo secundário IgG anti-coelho de cabra (H + L), acoplado com APC, 4050-11L, Southern Biotech. Entretanto, as outras células que compunham esse material, não foram melhor caracterizadas. É possível que eram compostas por neurônios, astrócitos, oligodentrócitos, células da glia, células endoteliais, células epiteliais e leucócitos que podem ter ficado aderidos na parede dos vasos, mas apresentaram também marcações pelos marcadores específicos dos receptores para o FNT- α e pelas moléculas da via do NF- κ B. Essas outras células do tecido cerebral foram então chamadas nesse trabalho como outras células do tecido cerebral e compunham-se de células do tecido cerebral exceto a micróglia.

4.7. Coleta e preparação dos macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram coletados no sexto dia da infecção dos quatro grupos dos três modelos (BALB/c, CBA e C57BL/6). Os procedimentos de retirada, quantificação, preparação e cultura dos

macrófagos foram realizados em ambiente estéril. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com 75mg/kg de cetamina (cloridrato de cetamina) e 10mg/kg de Xilazin (Cloridrato de xilazina 2%) (Sintec do Brasil Ltda) e eutanasiados em câmara de CO₂. Foi feita a assepsia da parede abdominal com álcool a 70%, os macrófagos foram recuperados por lavagem peritoneal com salina tamponada com fosfato, a 4°C, pH 7,2, com auxílio de pipeta Pasteur de vidro. Depois de centrifugados foram ressuspensos em RPMI incompleto (RPMI 1640 com 2,64% de NaH₂CO₃ 7,5%), quantificados em hemocitômetro de Neubauer utilizando solução de nigrosina 0,05%, sendo que a viabilidade foi sempre $\geq 95\%$. As células foram distribuídas 3×10^5 células por poço sobre lamínulas de vidro de 13mm, dispostas em placa de 24 poços, estéreis (KASVI). Incubadas por 2 h a 37°C em 5% de CO₂ para permitir a aderência dos macrófagos às lamínulas, em seguida foram adicionados ou não lipopolissacarídeo (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich), como controle positivo. As células foram então incubadas por mais 24 h, em estufa de CO₂ 5%. O experimento foi realizado em duplicata. Nos macrófagos peritoneais foram quantificados os corpúsculos lipídicos e no sobrenadante foi verificada a produção de óxido nítrico e a produção de citocinas.

Em nosso estudo, as células que foram nomeadas como macrófagos eram as células obtidas pelo lavado peritoneal, no qual há um grande predomínio de macrófagos. Entretanto, essa população pode conter uma pequena proporção de outras células da cavidade peritoneal também, que em nosso estudo não foram mais caracterizadas.

4.8. Coleta e preparação do sangue/soro

No sexto dia de infecção, após anestesia, eutanásia e assepsia, o sangue dos animais dos 4 grupos dos modelos BALB/c, CBA e C57BL/6 foi coletado por punção cardíaca, com seringa de 1mL. O soro foi obtido por centrifugação a 200 g por 5min, congelado a -80°C até o momento da análise das citocinas (Tabanez, 2006).

4.9. Efeito da pentoxifilina

4.9.1. Avaliação da sobrevida de camundongos do modelo BALB/c não susceptível, e modelos CBA e C57BL/6 susceptíveis à malária cerebral, infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA

A sobrevida foi avaliada nos animais infectados e tratados com a Ptx ou tratados com salina nos três modelos estudados BALB/c, CBA, C57BL/6: grupo Pb (n=10) e grupo Pb+Ptx (n=10). No dia da infecção os animais foram pesados, e o tratamento com a Ptx iniciou no terceiro dia de infecção, quando avaliado o peso, o hematócrito e a parasitemia. Para o modelo BALB/c esses parâmetros foram avaliados no terceiro, quinto, oitavo, décimo quinto e vigésimo primeiro dia, já nos modelos CBA e C57BL/6 foram avaliados no terceiro e quinto dia, pois a maioria dos animais já tinham morrido após esse período. Esses animais foram acompanhados e sua morte espontânea era anotada para a análise pela curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meyer.

4.9.2. Avaliação da evolução do peso dos camundongos BALB/c não susceptível e CBA, C57BL/6 susceptíveis à malária cerebral, infectados e ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA

Os animais eram sempre pesados pela manhã e era utilizada a mesma balança (OHAUS CT200-S, capacidade 200 g). O peso foi expresso em gramas.

4.9.3. Avaliação do hematócrito dos camundongos do modelo BALB/c não susceptível e modelos CBA, C57BL/6 susceptíveis à malária cerebral, infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA

Para avaliar o hematócrito o sangue foi retirado da ponta da cauda dos animais. O sangue foi disposto em capilar de vidro com EDTA e centrifugado por 10 min a 200g. O hematócrito foi determinado pela técnica de microhematócrito e calculado pela porcentagem de elementos figurados em relação à coluna total do sangue utilizando tabela padrão.

4.9.4. Avaliação da parasitemia em camundongos BALB/c não susceptível, CBA e C57BL/6 susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA

Para avaliação da parasitemia foi colhido uma gota de sangue da ponta da cauda dos camundongos. O sangue foi distendido sobre uma lâmina de vidro, fixados com metanol, corados com Giemsa e analisados em microscópio óptico, com aumento de 1000x, calculando o percentual de eritrócitos parasitados em 500 eritrócitos contados por preparação.

4.9.5. Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA

Para avaliar o efeito do tratamento com a Ptx sobre a expressão de corpúsculos lipídicos, utilizamos macrófagos peritoneais dos animais dos quatro grupos dos três modelos BALB/c, CBA e C57BL/6 como descrito no item 4.7. Após a incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 min, lavadas 2 vezes com STF, pH 7,2 e uma vez com álcool isopropílico a 60%. Em seguida, as células foram coradas com solução de óleo vermelho O (Sigma-Aldrich) por 15 min. O excesso do corante foi retirado com uma pipeta Pasteur e as poças foram lavadas uma vez com 1 ml de álcool isopropílico a 60% e depois duas vezes com 1 ml de STF. As preparações foram coradas com hematoxilina de Mayer, por 15 min, para marcar os núcleos celulares, lavadas com água destilada e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com uma fina camada de meio de montagem gelatinoso (10g de gelatina, 60 mL de água milliQ, 70 mL de glicerol e 0,25 g de fenol). O índice corpuscular (IC), o número de corpúsculos lipídicos que cada macrófago estava expressando, e a porcentagem de macrófagos que estavam expressando corpúsculos lipídicos foi determinado em 200 macrófagos. O índice corpuscular foi calculado pela multiplicação da proporção de células expressando corpúsculos lipídicos pela média de corpúsculos lipídicos expressos por célula (Borges, 2013).

4.9.6. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 susceptíveis à malária cerebral, infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA

Para avaliar o efeito do tratamento com a Ptx na produção de óxido nítrico, utilizamos macrófagos peritoneais dos animais dos quatro grupos dos três modelos BALB/c, CBA e C57BL/6 como descrito no item 4.7. Após a incubação, foi transferido 100µL por poço do sobrenadante das culturas para placa de 96 poços (TPP), em triplicata. A produção de óxido nítrico foi avaliada pela reação de Griess [(1-38 N naftiletileno diamina dihidroclorido) a 0,1 %, sulfanilamida a 1% e H₃PO₄ a 25 %] (Muniz-Junqueira e cols., 2005). A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa em 540 nm. A curva padrão de óxido nítrico foi feita pela diluição seriada de nitrito de sódio (NaNO₂). Iniciou com 200 µM e foram feitas as diluições de 1:2 até 1:128 em água destilada. Para o valor zero, foi utilizado apenas água destilada (0 µM).

4.9.7. Efeito do tratamento com a Pentoxifilina na produção de citocinas

4.9.7.1. Avaliação da produção de citocinas pelos macrófagos peritoneais, no soro e no homogenato do tecido cerebral dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA.

Para avaliar o padrão de produção, as citocinas foram avaliadas no soro, no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais e no homogenato do tecido cerebral dos animais dos 4 grupos de estudo nos 3 modelos experimentais (BALB/c, CBA e C57BL/6).

O Kit CBA tem como fundamento o uso de beads conjugadas com anticorpo de captura, os quais se ligam às citocinas. Cada tipo de bead possui diferente intensidade de fluorescência, assim, diversos tipos de citocinas podem ser analisados simultaneamente no citômetro de fluxo. O reagente de detecção é uma mistura de anticorpos conjugados com ficoeritrina (PE), que

fornece um sinal fluorescente em proporção à quantidade de citocinas ligada. As amostras (12,5µL) foram incubadas com as bead de captura (12,5µL) e o reagente de detecção (12,5µL) formando os complexos sanduíche (bead de captura + amostra + reagente de detecção). Simultaneamente à dosagem das amostras, foi preparada uma curva de calibração, a partir de uma diluição na proporção de 1/2 de um padrão contendo 5.000 pg/ml de cada citocina.

A intensidade de fluorescência em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa Diva versão 7 (BD Bioscience). A estratégia de detecção utilizou o template comercial do CBA previamente programado no citômetro no qual os sinais de FSC, SSC, PE e APC foram programados utilizando beads de calibração (set up). Para cada amostra e padrões da curva foram adquiridos 2.100 eventos. Os dados obtidos foram tratados no programa FCAP array versão 3 (BD Bioscience) utilizando a curva de calibração para calcular a quantidade de pg/mL das citocinas de cada amostra.

Foram considerados os limites de detecção para cada citocina analisada determinadas pelo fabricante. Foram considerados zero os valores que deram leitura abaixo dos limites de detecção: FNT < 0,9 pg/mL; IL-6 < 5 pg/mL; IFN-γ < 0,5 pg/mL; IL-12p70 < 10,7 pg/mL ; IL-2 < 0,1 pg/mL; IL-10 < 16,8 pg/mL; IL-4 < 0,03 pg/mL; IL-17A < 0,8 pg/mL; MCP-1 < 52,7 pg/mL.

4.10. Avaliação da expressão dos receptores para o FNT- α e das moléculas das vias canônica e não canônica do NF- κ B nas micróglia e outras células do tecido cerebral de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA

Após estímulo, a ativação da via do NF- κ B pode ocorrer pelas vias canônica ou não canônica e pode culminar na produção de citocinas inflamatórias, morte celular ou proliferação. Na infecção pelo plasmódio, o estímulo pode ser proveniente de antígenos do plasmódio estimulando essa via por meio dos receptores celulares para padrões moleculares de patógenos, como também, a ativação da via poderia ser mantida por estimular os receptores para o FNT- α , após a produção dessa citocina, levando a manutenção da ativação por sua ação em seus próprios receptores na superfície das células de modo autócrino, parácrino ou endócrino. A Figura -2 mostra de modo simplificado as moléculas da via do NF- κ B. As moléculas que foram avaliadas nesse estudo estão identificadas dentro do quadro verde.

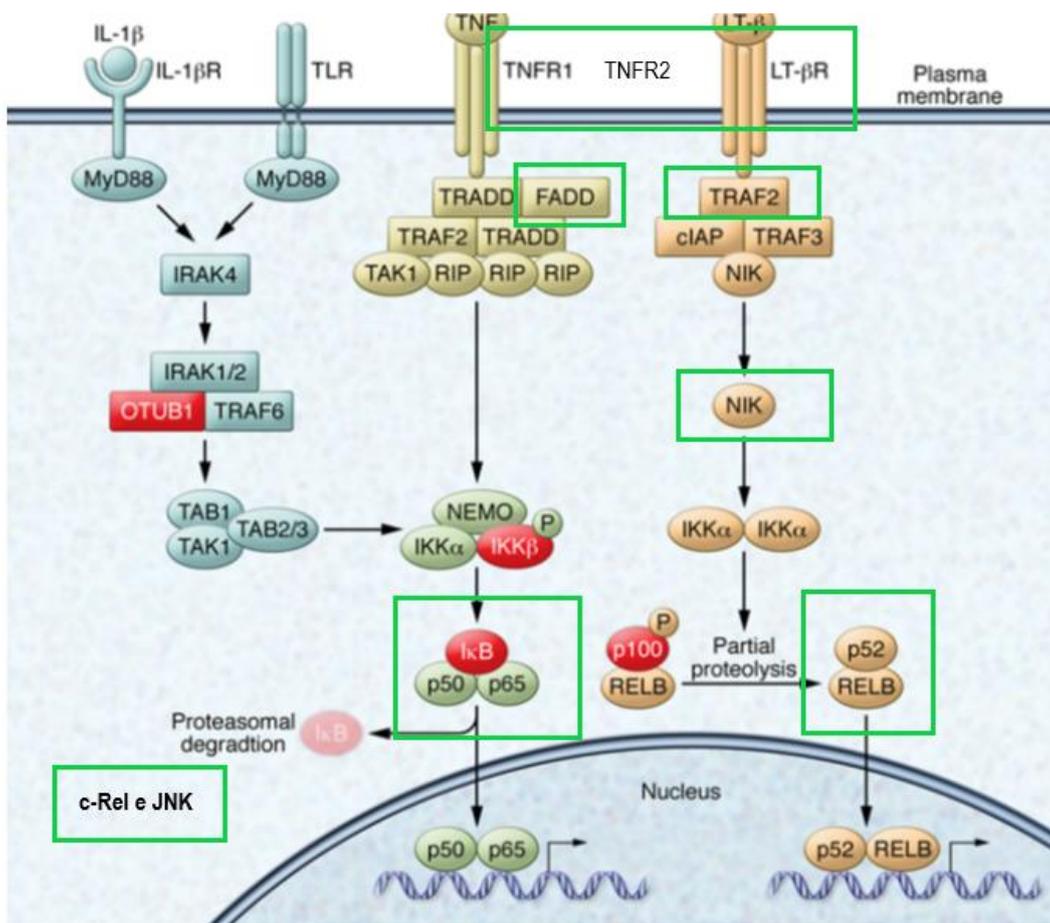


Figura 2 - Imagem adaptada de Taylor e cols (2016), mostrando na via do NF- κ B as moléculas que foram quantificadas, e que estão identificadas dentro dos quadros marcados em verde.

Avaliamos o efeito do tratamento com a pentoxifilina na expressão dos receptores para o FNT: receptor 1 FNT (r1 FNT), receptor 2 FNT (r2 FNT) e o receptor para linfotoxina (rLTX); na expressão das moléculas adaptadoras FADD e TRAF2; na expressão das moléculas JNK e NIK; na expressão do I κ B e na expressão de moléculas das vias canônica e não canônica do NF- κ B: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 e p52, na microglia e/ou em outras células do tecido cerebral de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (n = 5/grupo, repetido duas vezes).

As micróglia e outras células do tecido cerebral obtidas como descrito no item 4.6.2, foram incubadas em tubos cônicos com 300 μ L de solução de salina tamponada com fosfato (STF) com 1% de albumina e 1 M de EDTA, por

20 min, para bloquear as ligações inespecíficas. Em seguida, as células foram incubadas por 2 h com o marcador de micróglia, anticorpo policlonal anti-F4/80 (F4/80 Anticorpo (M-300); sc-25830, Santa Cruz Biotechnology), na diluição 1:200 em 100 μ L de STF, para marcar as micróglias. Após as duas horas, as células foram lavadas duas vezes com STF por centrifugação a 100g por 5 min e foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário IgG anti-coelho de cabra (H + L), acoplado com alofocianina (APC), 4050-11L, Southern Biotech, diluído em 100 μ L de STF. Após a marcação da micróglia, as células destinadas para a marcação dos receptores foram separadas (3×10^5 células por amostras para cada receptor), essas células foram distribuídas nos poços em placas e foram lavadas duas vezes com 100 μ L STF, e centrifugadas a 100 g, por 5 min. Foi então realizado o bloqueio com 100 μ L da solução de STF com 1% de albumina bovina por 20 minutos e lavadas 2 vezes com STF. Após esse procedimento, foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente com os anticorpos específicos para cada receptor. Para os receptores para o FNT- α , foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-r1-FNT de camundongo (r1-FNT Anticorpo (H-5); sc-8436, Santa Cruz Biotechnology), já acoplado com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), na diluição de 1:200 em 50 μ L de STF. As células foram então lavadas duas vezes com STF e suspensas em um volume final de 200 μ L de STF.

Para marcação dos outros receptores para o FNT- α (rLTX e r2FNT), foram feitos os seguintes procedimentos: As micróglias e outras células do tecido cerebral obtidas como acima descrito, marcadas com o marcador de micróglia (F4/80), distribuídas nas placas e realizado o bloqueio, foram lavadas 2 vezes com STF. Após, foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente com anticorpo monoclonal de camundongo anti-LT β R (LT β R Anticorpo (H-2); sc-398929, Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:200 em 50 μ L de STF, ou com anticorpo monoclonal de camundongo anti-r2FNT (FNT-R2 anticorpo (D-2); sc-8041, Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:200, em 50 μ L de STF. As células foram então lavadas duas vezes com STF

e foram incubadas novamente por 1h à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos secundários: IgG2B-FITC (FITC Rat Anti-Mouse IgG2b; sc-553395, BD Pharmingen) para r2-FNT e IgG1-FITC (FITC Mouse IgG, k Isotype Control, sc55616 BD Pharmingen) para LTXR, diluídos em 50 µL de STF. As células foram então lavadas duas vezes com STF e suspensas em um volume final de 200 µL.

Para analisar a expressão das moléculas p50, p52, p65 (RelA), IκB, JNK, nas micróglia e outras células do tecido cerebral obtidas como acima descrito e marcadas com o marcador de micróglia (F4/80), as células foram incubadas nos tubos cônicos com 300 µL de formaldeído a 2%, por 15 min em temperatura ambiente e lavadas duas vezes com 300 µL de Tween 20 a 0,2 % em STF, por centrifugação a 100 g por 5 min. Em seguida, as células foram permeabilizadas com uma solução contendo 300 µL de saponina 0,2 % em STF, por 20 min em temperatura ambiente e lavadas 2 vezes com Tween. Após esse procedimento, foi realizado o bloqueio com 300 µL de solução de STF com 1% de albumina bovina por 20 minutos e lavadas 2 vezes com Tween. Após o bloqueio, as células para todas as marcações intracelulares, foram distribuídas (3×10^5 células por amostras para cada molécula) nos poços em placas e incubadas com os anticorpos, sendo todos anticorpos monoclonais anti-p50 (NFκB p50 Anticorpo(E-10) Alexa Fluor® 488, sc-8414 AF488, Santa Cruz Biotechnology), anti-p52 (NFκB p52 Anticorpo (C-5) Alexa Fluor® 488, sc-7386), anti-p65 (RelA) (NFκB p65 Anticorpo (F-6) Alexa Fluor® 488, sc-8008, Santa Cruz Biotechnology), anti-p-IκB-α (p-IκB-α Anticorpo (B-9): sc-8404, Alexa Fluor® 488), e anti-JNK, acoplado com o fluorocromo FITC (p-JNK (G-7); sc-6254 Santa Cruz Biotechnology Inc.), numa diluição de 1:200 em 50 µL de STF contendo 0,05 de saponina, por uma noite, a 4°C. Após incubação, as poços foram lavados duas vezes com Tween, 1 vez em STF e suspensas em um volume final de 200 µL de STF.

Para analisar a expressão das moléculas RelB, TRAF, FADD, NIK nas micróglia e outras células do tecido cerebral, obtidas como acima descrito, marcadas com o marcador de micróglia (F4/80), fixadas com formaldeído a

2%, permeabilizadas com saponina, realizado o bloqueio e distribuídas nas placas, foram incubadas com os anticorpos primários, sendo, anticorpo monoclonal anti-p68 (RelB) (RelB Anticorpo (C-4) sc-48379, Santa Cruz Biotechnology), anticorpo monoclonal anti-TRAF (TRAF2 Anticorpo (F-2): sc-136999 Santa Cruz Biotechnology), anticorpo monoclonal anti-FADD, (FADD Anticorpo (G-4): sc271748, Santa Cruz Biotechnology), anticorpo policlonal anti-NIK (NIK Anticorpo (A-12); sc8417, Santa Cruz Biotechnology), numa diluição de 1:200 em 50 µL de STF contendo 0,05 de saponina, por uma noite, a 4°C. Após incubação, os poços foram lavados duas vezes com Tween e incubados novamente por 1 h, em temperatura ambiente, com os anticorpos secundários, sendo o IgG2B-FITC (FITC Rart Anti-Mouse IgG2b sc-553395, BD Pharmingen) e IgG1-FITC (FITC Mouse IgG, k Isotype Control, sc55616 BD Pharmingen) para FADD e NIK e IgG1-FITC (IgG1-FITC (FITC Mouse IgG, k Isotype Control, sc55616 BD Pharmingen) para TRAF e RelB, numa diluição de 1:200, em 50 µL de STF com 0,05% de saponina. Em seguida foram lavadas uma vez em STF e suspensas em um volume final de 200 µL de STF.

Quando analisamos a expressão da molécula c-Rel, não foi possível fazer a marcação da micróglia nas células destinadas para a marcação da molécula c-Rel, pois o anticorpo secundário para marcar a micróglia (anticorpo secundário IgG anti-coelho de cabra (H+L), acoplado com APC, 4050-11L, Southern Biotech), que tínhamos disponível para utilização, era o mesmo marcador utilizado para marcar o anticorpo anti c-Rel. Foram consideradas então apenas as outras células do tecido cerebral. As células obtidas foram distribuídas (3×10^5 células por amostra) nos poços em placas de 96 poços (TPP), estéril e fixadas com formaldeído a 2%, permeabilizadas com saponina, realizado o bloqueio e distribuídas nas placas, foram incubadas com os anticorpos primários, sendo anticorpo policlonal anti-c-Rel (c-Rel Anticorpo (N): sc-70, Santa Cruz Biotechnology), numa diluição de 1:200 em 50µL de STF contendo 0,05 de saponina, por uma noite, a 4°C. Após incubação, os poços foram lavados duas vezes com Tween 20 e 1 vez em STF e incubados novamente por 1 h, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário, sendo IgG anti-coelho de cabra (H + L), acoplado com

APC, 4050-11L, Southern Biotech, numa diluição de 1:200, em 50 µL de STF com 0,05% de saponina. Em seguida foram lavadas 1 vez em STF, pH 7,2 e suspensas em um volume final de 200 µL de STF. Como controle positivo para cada molécula que analisamos, foram acrescentados ao experimento células coletadas de camundongos BALB/c estimuladas com 10 ng/mL de LPS, por 6 h antes de serem submetidas a todos os outros procedimentos descritos acima. Também foram acrescentadas ao experimento células incubadas somente com os anticorpos secundários (IgG anti-coelho de cabra (H + L), acoplado com alofococianina (APC), 4050-11L, Southern Biotech), IgG2B-FITC (FITC Rart Anti-Mouse IgG2b sc-553395, BD Pharmingen) e IgG1-FITC (FITC Mouse IgG, k Isotype Control, sc55616 BD Pharmingen), utilizados em nosso experimento, como controle negativo. Foram utilizadas células não marcadas de camundongos BALB/c para fazer o ajuste do citômetro, quanto ao tamanho e granulosidade. A intensidade de fluorescência em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa Diva versão 7 (BD Bioscience) e os dados foram avaliados utilizando o programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, EUA).

4.10.1. Estratégias para leitura no citômetro

Estratégia utilizada para detecção por citometria de fluxo e a quantificação da proteína F4/80 para avaliar a expressão do receptor 1 FNT (r1 FNT), receptor 2 FNT (r2 FNT) e o receptor para linfotóxina (rLTX); da expressão das moléculas adaptadoras FADD e TRAF; a expressão das moléculas JNK e NIK; a expressão do I κ B e a expressão de moléculas das vias canônica e não canônica do NF- κ B: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 e p52 está descrita abaixo.

A população de interesse foi selecionada no gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade/complexidade (SSC) das células, para excluir os debris e grumos celulares e para cada análise foi feito um histograma com a contagem de eventos (eixo Y) pela intensidade de fluorescência (eixo X), realizando a exclusão da fluorescência natural das amostras por meio da análise de células

não-marcadas (Figura 3). Seleção das células positivas para micróglia no gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade/complexidade (SSC) está mostrada na figura 4-A, B e figura 4-C histograma pela intensidade de fluorescência. Todas as análises foram realizadas com a aquisição de 10 mil eventos e ponto de corte (*threshold*) de mil.

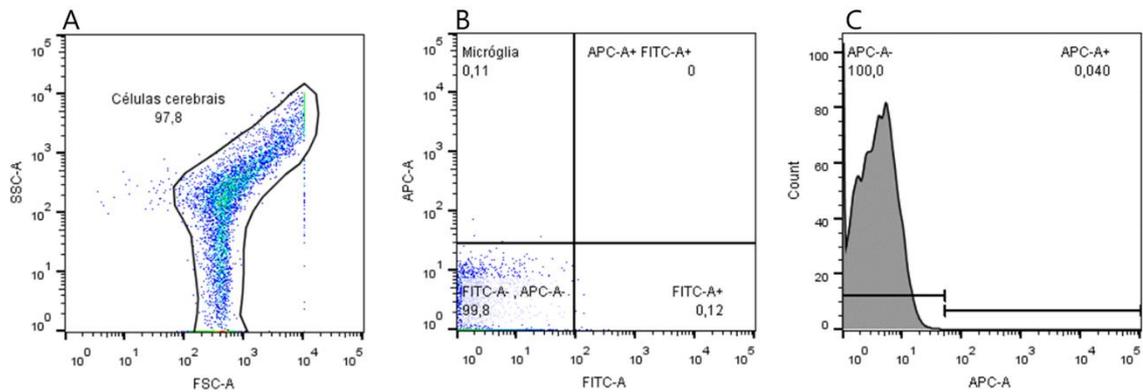


Figura 3: A, B - Seleção da população de interesse no gráfico de tamanho (FSC) por complexidade/granulosidade (SSC) das células, C- histograma com a contagem de eventos (eixo Y) pela intensidade de fluorescência (eixo X), realizando a exclusão da fluorescência natural das amostras por meio da análise de células não-marcadas.

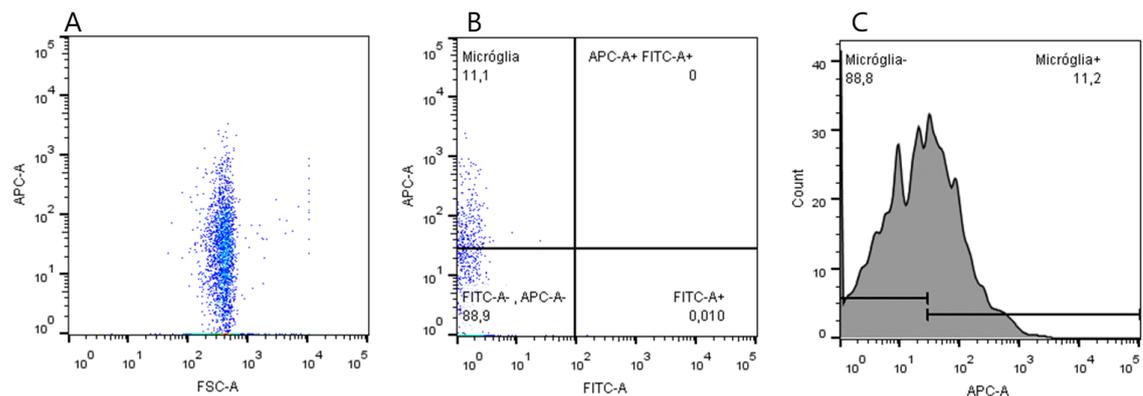


Figura 4: A, B e C - Seleção das células positivas para marcação da micróglia.

4.11. Análises estatísticas

Os dados foram analisados previamente para normalidade das amostras. E segundo a normalidade e a variância entre as amostras, foram utilizados testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos indicados segundo o número de grupos e a normalidade das amostras. Para dois grupos foram aplicados o teste t para amostras com distribuição normal ou Mann-Whitney para aquelas que não tiverem distribuição normal. Para mais do que 2 grupos foram utilizados os testes ANOVA seguido pelo método de Student Newman Keuls ou Tukey para grupos com distribuição normal ou Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para as que não tiverem distribuição normal.

A curva de Kaplan-Meier foi usada para representar a sobrevida dos animais, o teste de Mantel-Cox log-rank e o teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon foram utilizados para comparar estatisticamente as diferenças nas sobrevidas dos animais.

RESULTADOS

5.1. Curva de sobrevida

Avaliação da sobrevida de camundongos do modelo BALB/c não susceptível e modelos CBA e C57BL/6 susceptíveis à malária cerebral infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA

Para avaliar a influência da pentoxifilina (Ptx) na sobrevida dos animais dos três modelos estudados, foi feita a curva de sobrevida de Kaplan-Meier, utilizando 10 animais por grupo. O tratamento com a Ptx aumentou estatisticamente a sobrevida somente dos camundongos CBA, retardando em um dia a morte dos animais do grupo Pb+Ptx em relação ao grupo Pb. Os animais do grupo Pb começaram a morrer no sexto dia após a infecção, enquanto os animais do grupo Pb+Ptx começaram a morrer no sétimo dia (teste Log-rank = 3,926; p= 0,047 e teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon = 4,357, p=0,036). Figura 5-B. Nos modelos BALB/c e C57BL/6 não houve diferença estatística após o tratamento com a Ptx. Para os camundongos BALB/c do grupo Pb o primeiro animal morreu no décimo dia após a infecção e o último no vigésimo quarto dia após a infecção; e para o grupo Pb+Ptx, os camundongos começaram a morrer no oitavo dia após a infecção, e o último animal morreu no vigésimo primeiro dia; Todavia, embora sem significância estatística, aparentemente o tratamento com a Ptx piorou a evolução da doença no modelo BALB/c, pois, o último animal BALB/c do grupo Pb+Ptx morreu no vigésimo primeiro dia da infecção, enquanto 20% dos animais do grupo Pb permaneceram vivos por mais 3 dias, figura 5-A. Já para o modelo C57BL/6, 70% dos animais do grupo Pb morreram no sétimo dia e 20% no oitavo dia, enquanto os animais do grupo Pb+Ptx, 50% morreram no sétimo dia e 50% no oitavo dia, figura 5-C. Camundongos CBA e C57BL/6 do grupo Pb começaram a morrer no sexto dia após a infecção, enquanto no grupo Pb+Ptx começaram a morrer no sétimo dia, entretanto, os últimos animais dos dois grupos morreram no oitavo dia após a infecção.

As curvas de sobrevivência foram feitas pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística foi avaliada pelo teste de Logrank.

Conclusão. Nos modelos susceptíveis à forma cerebral da malária, embora a Ptx tenha retardado o dia de morte de parte dos animais tratados,

somente para os camundongos CBA, o aumento da sobrevida foi estatisticamente significativo. Já no modelo BALB/c resistente à forma cerebral da doença, mas que evolui para anemia grave, o tratamento com a pentoxifilina nessa dose antecipou a morte dos animais em relação ao grupo tratado com salina, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

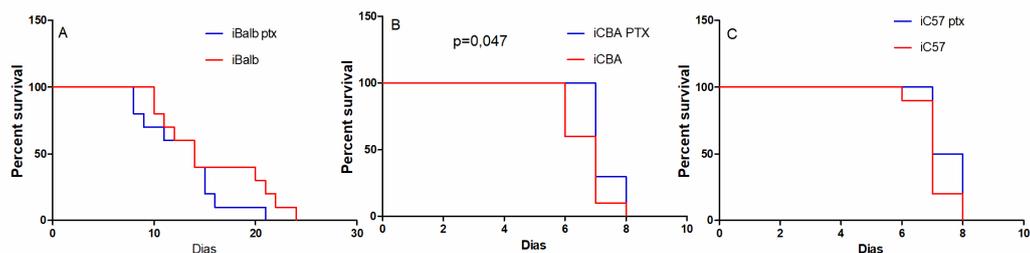


Figura-5. Avaliação do efeito da pentoxifilina sobre a curva de sobrevida de camundongos infectados com 10^6 eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA ($n = 10$ animais por grupo). Em A - BALB/c - (teste Log-rank = 0,1445; $p = 0,2294$ e teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon = 0,8289, $p = 0,3626$); Em B- CBA/J (teste Log-rank = 3,926; $p = 0,0476$ e teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon = 4,357, $p = 0,0369$); Em C- C57BL/6 (teste Log-rank = 2,333; $p = 0,1267$ e teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon = 2,356, $p = 0,1248$).

5.2. Evolução do peso

Avaliação da evolução do peso dos camundongos não susceptível BALB/c, susceptíveis CBA e C57BL/6 à malária cerebral infectados com *Plasmodium berghei* ANKA

O peso de cada animal do modelo BALB/c foi aferido no primeiro, terceiro, quinto, oitavo, décimo quinto e vigésimo primeiro dia. Para os animais CBA e C57BL/6, os pesos foram aferidos somente no primeiro, terceiro e quinto dia, pois a maioria dos animais já tinha morrido no oitavo dia de infecção.

Não houve diferença nas medianas dos pesos entre os grupos Pb e Pb+Ptx, do mesmo modelo, no dia zero. Figura 6. Os animais avaliados quanto à evolução do peso foram os mesmos em que foi analisado o tempo de sobrevida.

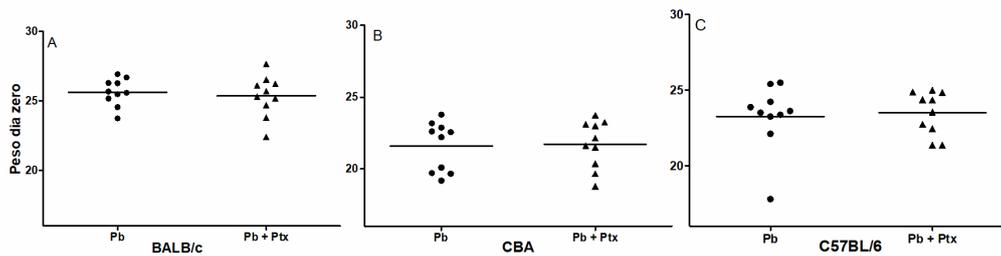


Figura-6: Avaliação do peso no dia zero: Camundongos infectados com *P. berghei* ANKA, tratados ou não com pentoxifilina. 10 animais por grupo. Em A - BALB/c - $p= 0,6336$, teste t; Em B- CBA - $p= 0,8560$, teste t; Em C- C57BL/6 - $p= 0,9705$, Mann Whitney. Nota: Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

A análise comparativa entre os grupos infectados pelo plasmódio e tratados ou não com a pentoxifilina foi feita pela variação percentual do peso ($\Delta\%$). Verificou-se que a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA ocasionou perda de peso progressiva nos animais dos modelos BALB/c e C57BL/6, figura 7-A, C. Entretanto, no modelo CBA, não houve perda de peso durante os dias da infecção, figura 7-B. Observamos que no terceiro dia de infecção, no mesmo dia que iniciou o tratamento dos animais com a Ptx, o grupo Pb+Ptx do modelo C57BL/6 apresentou uma maior perda de peso que o grupo Pb, figura 6 C. Não houve diferença entre os grupos para os animais BALB/c e CBA, figura 7 A, B. No quinto dia da infecção, também não houve diferença no $\Delta\%$ do peso dos animais BALB/c e CBA entre os grupos tratados ou não, e no C57BL/6, no grupo tratado com a Ptx a perda de peso foi maior que no grupo tratado com salina. Para o modelo BALB/c, no oitavo, décimo quinto e vigésimo primeiro dia da infecção, não houve nenhuma diferença na perda progressiva de peso entre os grupos tratados com Ptx ou salina. Tabela 1 e figura 7A, B, C.

Conclusão: A infecção pelo Pb ocasionou perda de peso progressiva nos animais do modelo BALB/c e o tratamento com a Ptx não evitou essa perda de peso. No modelo C57BL/6, o tratamento com a Ptx aumentou a perda de peso ocasionada pela infecção. Os animais do modelo CBA não tiveram perda de peso progressiva durante a infecção.

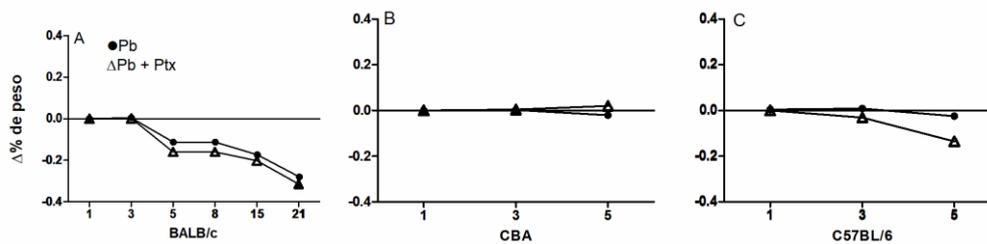


Figura-7: Avaliação do efeito da pentoxifilina sobre o delta % do peso de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA, 10 animais por grupo. Em A. Grupos de camundongos BALB/c – Não houve diferença estatística nos $\Delta\%$ entre os grupos Pb e Pb+Ptx durante a infecção, teste t; Em B- CBA – Não houve diferença estatística nos $\Delta\%$ entre os grupos Pb e Pb+Ptx durante a infecção, Mann Whitney; Em C- C57BL/6 – No terceiro dia de infecção o grupo Pb+Ptx perdeu mais peso que o grupo Pb ($p= 0,0007$, Mann Whitney), no quinto dia de infecção o grupo Pb+Ptx perdeu mais peso que o grupo Pb ($p= 0,0147$, Mann Whitney). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos

Tabela 1- Avaliação do peso dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

DELTA % PESO				
Grupos				
Modelos	Dia	Salina	Pentoxifilina	Teste /p
BALB/c	3	0,004 (-0,011 – 0,036)	0,002 (-0,011 – 0,011)	t / 0,3560
	5	0,008 (-0,048 – 0,020)	0,025 (-0,037 – 0,041)	t / 0,3335
	8	-0,114 (-0,170 – -0,086)	-0,159 (-0,175 – -0,105)	t / 0,1952
	15	-0,174 (-0,191 – 0,039)	-0,202 (-0,264 – -0,126)	t / 0,2917
	21	-0,280 (-0,323 – 0,092)	-0,314 (-0,331 – -0,264)	t / 0,3764
CBA	3	0,001 (-0,002 – 0,004)	0,003 (-0,026 – 0,007)	M-W / 0,9705
	5	-0,021 (-0,055 – 0,029)	0,020 (-0,087 – 0,040)	M-W / 0,9118
C57BL/6	3	0,004 (-0,009 – 0,005)	-0,031 (-0,048 – -0,020)	M-W / 0,0007
	5	-0,029 (-0,084 – -0,018)	-0,136 (-0,141 – -0,066)	M-W / 0,0147

Teste t, teste de Mann Whitney. Os valores estão expressos como mediana / intervalo interquartil, Valor de p significativo quando $<0,05$. Ptx, pentoxifilina; Pb, *Plasmodium berghei*.

5.3. Hematócrito e parasitemia

Avaliação do hematócrito e parasitemia dos camundongos do modelo BALB/c não susceptível e modelos CBA/J e C57BL/6 susceptíveis à malária cerebral, infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA.

O hematócrito e a parasitemia foram avaliados no sangue retirado da ponta da cauda dos camundongos, no 3º e 5º dia, nos modelos BALB/c, CBA e C57BL/6, e no modelo BALB/c também foi verificado no 8º, 15º e 21º dia.

No terceiro dia de infecção, quando iniciou o tratamento com a Ptx, e no quinto dia, não houve diferença no hematócrito entre os grupos nos três modelos estudados BALB/c, CBA, C57BL/6, figura 8A, B, C. No oitavo dia de infecção, o tratamento com a pentoxifilina diminuiu o hematócrito dos animais do modelo BALB/c, porém no décimo quinto e vigésimo primeiro dia, já não havia diferença estatística no hematócrito entre os grupos de animais tratados com Ptx ou com salina. Tabela 2 e Figura 8 A.

A carga parasitaria dos animais aumentou durante a evolução da infecção pelo plasmódio e apenas no quinto dia da infecção, os animais CBA do grupo tratado com a pentoxifilina apresentaram uma carga parasitaria maior que os animais do grupo tratado com salina, figura 9-B. No terceiro dia de infecção quando iniciou o tratamento com a Ptx, não houve diferença na parasitemia entre os grupos nos três modelos estudados BALB/c, CBA e C57BL/6, figura 9 A, B, C. No quinto dia de infecção, o tratamento com a pentoxifilina nessa dose aumentou a parasitemia nos animais CBA figura 9, B e não influenciou a parasitemia dos animais BALB/c e C57BL/6 figura 9 A, C. Não verificamos nenhuma diferença na carga parasitária do BALB/c no oitavo, no décimo quinto e vigésimo primeiro dia de infecção, nos grupos tratados com Ptx e salina, tabela 3 e figura 9 A.

Em conclusão, o tratamento com a pentoxifilina na dose utilizada aumentou a anemia nos animais BALB/c. Nos animais CBA e C57BL/6, o tratamento com a pentoxifilina não influenciou o hematócrito. No quinto dia de infecção os animais CBA do grupo tratado com a Ptx apresentaram uma carga parasitária maior que os animais do grupo não tratado. Os animais dos modelos CBA e C57BL/6, quando infectados com Pb começam a morrer no

sexto dia de infecção e geralmente não sobrevivem mais que o oitavo dia, e morrem com uma parasitemia bem menor quando comparado com os animais BALB/c.

Tabela 2- Avaliação do hematócrito dos animais BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA.

Hematócrito				
Grupos				
Modelo	Dia	Salina	Pentoxifilina	Teste /p
BALB/c	3	54,00 (53,75 – 57,25)	53,00 (51,00 – 56,00)	t / 0,4328
	5	51,00 (48,00 – 52,00)	46,00 (26,75 – 53,50)	t / 0,1028
	8	40,00 (34,00 – 46,00)	32,00 (21,50 – 37,00)	t / 0,0474
	15	25,50 (14,25 – 49,50)	16,00 (11,00 – 44,00)	t / 0,6859
	21	18,00 (10,00 – 54,00)	16,00 (11,00 – 41,00)	t / 0,7902
CBA	3	48,00 (41,75 – 52,50)	49,00 (44,75 – 53,25)	t / 0,5734
	5	40,00 (28,25 – 45,75)	38,00 (33,50 – 50,00)	t / 0,4940
C57BL/6	3	45,50 (43,25 – 52,25)	45,50 (43,00 – 49,75)	M-W / 0,8196
	5	41,50 (30,75 – 48,25)	43,50 (40,00 – 48,00)	t / 0,3811

Os valores são expressos como: mediana (intervalo interquartil)
t = Teste t; M-W = teste de Mann-Whitney.

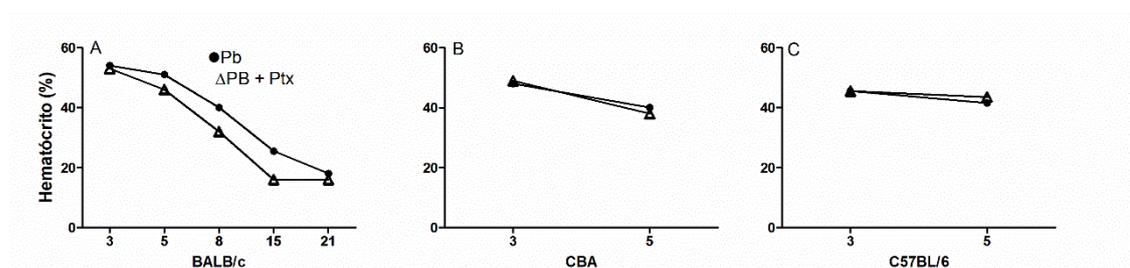


Figura –8– Avaliação do efeito da pentoxifilina sobre o hematócrito dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Grupos (Pb e Pb+Ptx), n= 10. A- BALB/c; B -CBA; C57BL/6. No 8º dia de infecção os animais BALB/c do grupo Pb apresentaram maior hematócrito que os animais BALB/c do grupo Pb+Ptx ($p=0,0474$), teste t. Os valores estão expressos como mediana. Valor de p significativo quando $<0,05$. Ptx, pentoxifilina; Pb, *Plasmodium berghei*.

Tabela 3- Avaliação da carga parasitária dos animais BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

Modelos	Dias	Parasitemia Grupos		
		Salina	Pentoxifilina	Teste /p
BALB/c	3	1,000 (0,350 - 2,00)	1,000 (0,350 - 2,550)	M-W/0,7894
	5	8,200 (6,175 - 9,100)	5,100 (3,800 - 8,050)	M-W/0,1655
	8	24,05 (19,45 - 26,93)	25,10 (18,45 - 26,93)	t / 0,9905
	15	32,00 (26,75 - 36,50)	36,00 (25,50 - 49,80)	t /0,4592
	21	45,00 (42,00 - 46,00)	30,20 (27,00 - 44,00)	t /0,1187
CBA	3	1,000 (0,490 - 2,300)	0,900 (0,350 - 2,750)	t / 0,9409
	5	5,350 (4,500 - 6,763)	7,800 (5,900 - 8,625)	t / 0,0391
C57BL/6	3	0,900 (0,370 - 1,700)	1,400 (0,950 - 2,450)	t / 0,2764
	5	5,500 (3,550 - 8,600)	5,950 (3,898 - 9,700)	M-W /0,7911

Os valores são expressos como: mediana (intervalo interquartil)
t =Teste t; M-W = teste de Mann-Whitney.

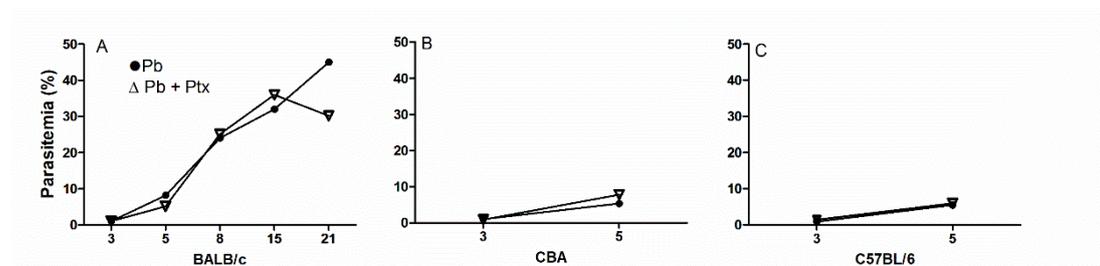


Figura- 9 - Avaliação do efeito da pentoxifilina na parasitemia dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA. grupos (Pb e Pb+Ptx), n= 10. A- BALB/c; B -CBA; C57BL/6. No 5º dia de infecção os animais CBA do grupo Pb+Ptx apresentaram maior parasitemia que os animais CBA do grupo Pb (p = 0,0391), teste t. Os valores estão expressos como mediana. Valor de p significativo quando <0,05. Ptx, pentoxifilina; Pb, *Plasmodium berguei*.

5.4. Corpúsculos lipídicos

Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados e ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA

A ativação do metabolismo lipídico foi avaliada pela quantificação dos CL pela técnica do Oil red, avaliando o índice corpuscular (IC), a média de CL por macrófago e a porcentagem de macrófagos que apresentavam CL.

Nas figuras 10 e 11 e na Tabela 4 estão apresentados os resultados dos corpúsculos lipídicos.

No grupo controle normal observamos que o modelo C57BL/6 mostrava a maior expressão do índice corpuscular e o modelo BALB/c, o menor (Figura-11I). Na infecção pelo plasmódio o CBA mostrou maior percentual de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos que os outros dois modelos, entretanto após o tratamento com a Ptx o modelo CBA mostrou menor percentual de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos que o modelo C57BL/6 (Figura 11C,D). A infecção pelo plasmódio determinou aumento da expressão dos corpúsculos lipídicos mostrada pelo aumento do índice corpuscular em todos os modelos (Figura 10 G,H,I). Esse aumento foi determinado pelo somatório de um pequeno aumento no número de partículas expressas por macrófago mais o número de macrófagos expressando os corpúsculos lipídicos (Figura 10A,B,C,D,E,F), pois somente no modelo CBA houve aumento significativo do número de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos (Figura 10B). O tratamento com a Ptx dos animais infectados (Pb+Ptx) não modificou o aumento dos corpúsculos lipídicos nos modelos BALB/c e C57BL/6 (Figura 10G,I), mas não no modelo CBA, no qual o tratamento diminuiu a expressão dos corpúsculos lipídicos (Figura 10H). O aumento do índice corpuscular no modelo BALB/c deveu-se ao aumento maior na média de corpúsculos lipídicos expressos por macrófago (Figura 10 A,D,G). Enquanto que, nos modelos CBA e C57BL/6 o aumento do IC deveu-se ao aumento maior no percentual de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos (Figura 10 C,F,I).

Tabela 4 - Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais dos animais BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

Percentual de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos					
Grupos	Controle	Ptx	Pb	Pb + Ptx	Teste /p
BALB/c	12,50 (9,750 – 18,25)	22,00 (6,750 – 45,65)	16,30 (13,20 – 31,75)	23,80 (12,35 – 92,25)	0,1547
CBA	17,80 (10,25 – 25,60)	15,00 (10,00 – 27,00)	61,00 (20,50 – 76,75)	19,80 (8,000 – 33,20)	0,0456
C57BL/6	11,30 (7,150 – 18,55)	15,00 (10,00 – 28,25)	26,50 (8,650 – 45,50)	34,80 (18,05 – 61,75)	0,0044
Média de corpúsculos por macrófagos					
BALB/c	1,253 (1,108 – 1,480)	1,647 (1,446 – 2,105)	1,467 (1,185 – 2,756)	1,799 (1,467 – 2,989)	0,0352
CBA	1,485 (1,289 – 1,851)	1,533 (1,333 – 1,593)	2,423 (1,200 – 3,456)	1,539 (1,151 – 1,908)	0,2315
C57BL/6	1,329 (1,183 – 1,725)	1,528 (1,299 – 2,066)	1,706 (1,251 – 2,273)	1,741 (1,532 – 2,670)	0,1085
Índice Corpuscular (% X média)					
BALB/c	14,00 (10,60 – 19,50)	39,50 (10,00 – 94,25)	24,60 (18,20 – 100,5)	37,30 (17,05 – 284,5)	0,0443
CBA	27,70 (11,40 – 40,75)	21,00 (14,00 – 43,00)	190,5 (28,25 – 267,0)	35,20 (11,00 – 63,30)	0,0458
C57BL/6	19,00 (14,25 – 32,00)	14,00 (8,650 – 17,20)	78,00 (19,20 – 118,1)	45,20 (29,05 – 162,5)	P<0.0001

Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn: Os valores são expressos como mediana / intervalo interquartil, Valor de p significativo quando <0,05. Ptx, pentoxifilina; Pb, *Plasmodium berghei*.

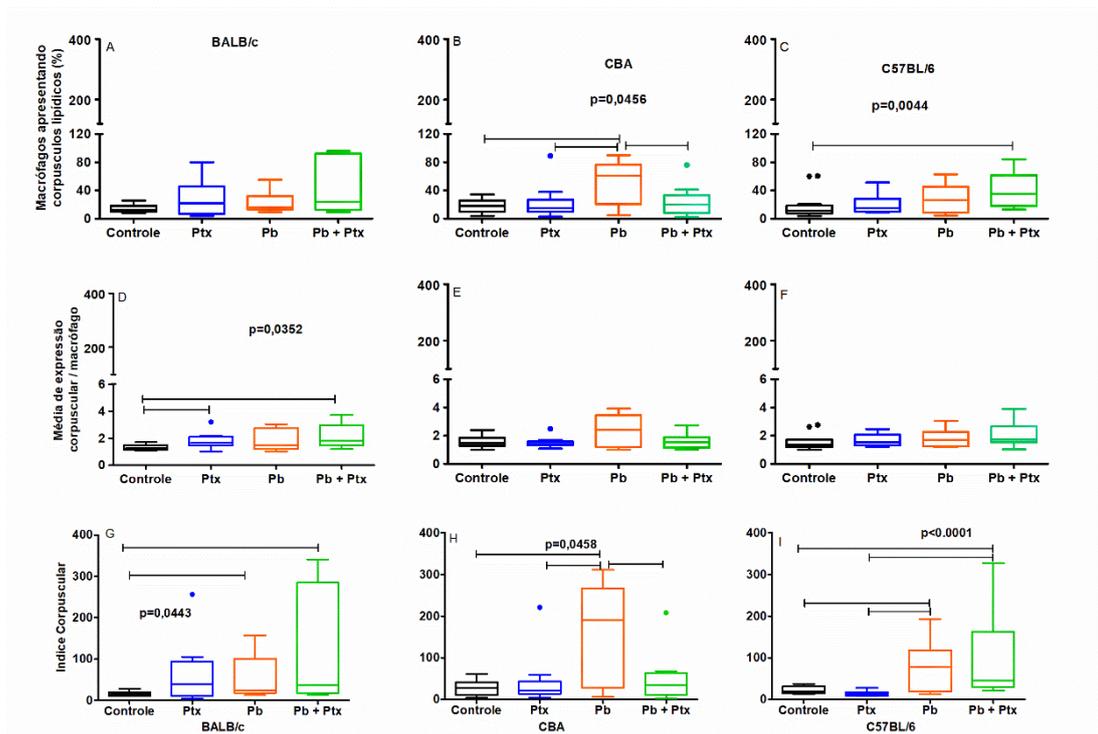


Figura-10: Avaliação do efeito da pentoxifilina na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados e ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. Percentual de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos- A - BALB/c, $p = 0,1547$; B - CBA, $p = 0,0456$; C- C57BL/6 $p = 0,0044$. Média de expressão corpuscular por macrófago - D- BALB/c $p = 0,0352$; E- CBA $p = 0,2315$; F- C57BL/6 $p = 0,1085$. Índice corpuscular - G- BALB/c, $p = 0,0443$; H - CBA $p = 0,0458$; I - C57BL/6 $p < 0,0001$. Teste, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn. Índice corpuscular - G- BALB/c (controle X Pb), $p = 0,0453^1$; H - CBA (controle X Pb), $p = 0,0166^2$, (Ptx X Pb), $p = 0,0363^1$, (Pb X Pb+ Ptx), $p = 0,0303^1$; I - C57BL/6 (controle X Pb), $p = 0,0411^1$. Teste, ¹Mann Whitney, ²teste t. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

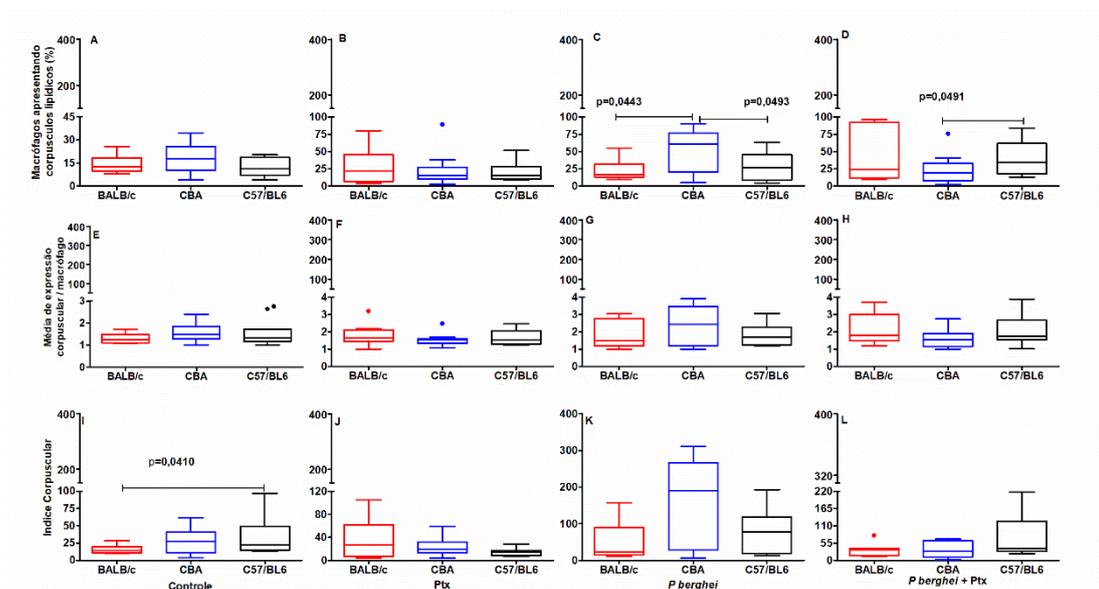


Figura-11: Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. Percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos; A- controle, ($p = 0,3697^1$); B- Ptx, ($p=0,8419^1$); C - Pb, ($p = 0,0647^1$); D - Pb+Ptx, ($p = 0,1196^1$). Média de expressão corpuscular por macrófagos: E- Controle, ($p= 0,2608^1$); F- Ptx, ($p=0,5273^1$); G - Pb, ($p = 0,2162^2$); H - Pb+Ptx, ($p = 0,2476^1$). Índice corpuscular: I- Controle, ($p = 0,1069^1$); J- Ptx, ($p = 0,1038^1$); L- Pb, ($p = 0,1084^1$); M- Pb + Ptx, ($p = 0,2522^1$). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey. Percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos; C - Pb, (BALB/c x CBA, $p = 0,0443^3$), (CBA X C57BL/6, $p = 0,0493^4$); D - Pb+Ptx, ($p = 0,0491^4$). Índice corpuscular: I- Controle, ($p = 0,0410^3$), ³teste de Mann Whitney, ⁴teste t.

5.5. Óxido Nítrico

Avaliação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA

Observamos que a infecção pelo plasmódio (Pb) induziu uma maior produção do óxido nítrico nos modelos CBA e C57BL/6 em relação ao grupo controle normal e o tratamento com a Ptx dos animais infectados diminuiu a produção de NO no modelo C57BL/6 (Figura 12 B, C). O tratamento com a Ptx dos animais CBA não infectados (grupo Ptx) aumentou a concentração de NO nesse grupo em relação ao grupo controle (Figura 12B). Quando comparamos os modelos estudados, observamos que na infecção pelo plasmódio o modelo BALB/c produziu a menor quantidade e o modelo CBA a

maior quantidade do óxido nítrico e após o tratamento com a Ptx dos animais infectados o C57BL/6 mostrou menor quantidade e o CBA maior quantidade de NO (Figura 13C,D). (Tabela 5).

Conclusão: Os animais CBA e C57BL/6, que são susceptíveis à malária cerebral, mostraram maior concentração de NO após a infecção pelo plasmódio. E após o tratamento com a Ptx dos animais infectados (Pb+PTX) houve menor produção do NO pelos macrófagos dos camundongos C57BL/6.

Tabela 05 – Avaliação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais, dos animais BALB/c, CBA, C57BL/6, infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, concentração expressa em μM .

Grupos	Controle	Ptx	Pb	Pb + Ptx	Valor de p
BALB/c	38,17 (27,20–50,71)	37,46 (23,71–94,32)	39,39 (36,76 – 60,65)	35,09 (21,07– 44,38)	0,3540
CBA	31,81 (24,52 – 69,38)	69,29 (37,63 – 122,7)	66,36 (49,28 –112,4)	58,10 (29,63 –146,1)	0,0010
C57BL/6J	48,67 (0,6285 –1,392)	38,28 (23,60 – 51,56)	55,29 (45,68 – 94,27)	12,86 (12,75 – 39,34)	0,0008

Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn. Os valores são expressos como mediana / intervalo interquartil, Valor de p significativo quando $<0,05$. Ptx, pentoxifilina; Pb, *Plasmodium berghei*.

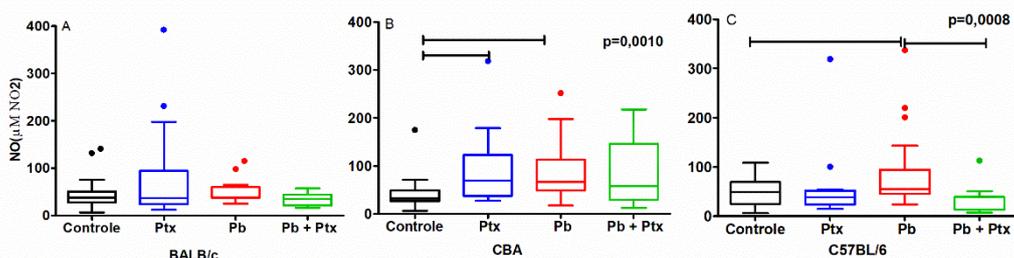


Figura-12: Avaliação do efeito da pentoxifilina na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, concentração expressa em μM . A - BALB/c, $p = 0,3540$; B – CBA, $p = 0,0010$; C – C57BL/6, $p = 0,0008$, (teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn). Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. C – C57BL/6 (controle X Pb), $p = 0,0581$, (teste, Mann Whitney).

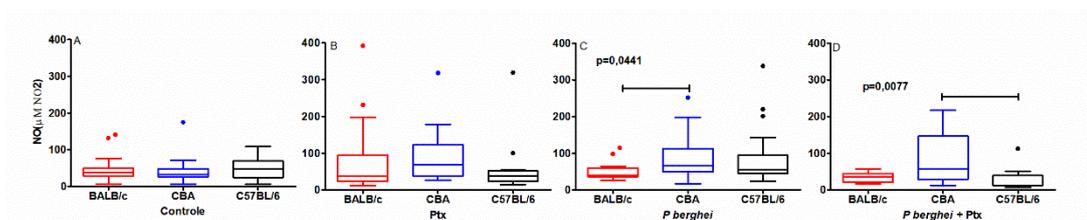


Figura 13 - Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, concentração expressa em µM. Controle, $p = 0,2429$. Ptx, $p = 0,1456$. Pb, $p = 0,0441$. Pb+Ptx, $p = 0,0077$. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

5.6. Citocinas

5.6.1. Fator de necrose tumoral(FNT- α)

Avaliação da produção de Fator de Necrose Tumoral- α (FNT- α) pelos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA

A resposta inflamatória exacerbada tem um papel importante nas formas graves da malária, e o FNT- α é uma das principais citocinas inflamatórias consideradas envolvidas na patogenia das formas graves da doença.

Para avaliar a produção do FNT- α nos diferentes modelos, quantificamos a citocina no soro, no sobrenadante dos macrófagos peritoneais e no homogenato do tecido cerebral, nos 3 modelos estudados.

As figuras 14 e 15 mostram a produção do FNT- α pelos três modelos nos quatro grupos de estudo.

Pela análise dos sobrenadantes das culturas dos macrófagos peritoneais, na situação basal (grupo controle), observamos que os macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c já produziam maior quantidade do FNT- α do que os macrófagos dos camundongos CBA e C57BL6 (Figura 15 E, tabela 7). Entretanto, quando analisamos no homogenato do tecido cerebral, observamos que já havia na situação basal (grupo controle) maior produção do FNT- α pelas células cerebrais dos

camundongos C57BL6 do que pelas células dos camundongos CBA (Figura 15 I, tabela 8).

Quando avaliamos a resposta à infecção, observamos que houve maior níveis séricos do FNT- α pelos grupos infectados pelo plasmódio (Grupo Pb) em relação aos animais controles normais, nos três modelos de estudo (Figura 14 A, B, C, tabela 6). Estas diferenças não foram evidenciadas quando testadas no sobrenadante das culturas e no homogenato do tecido cerebral (Figura 14 D, E, F, G, I, H, tabelas 7 e 8).

Quando analisamos a produção do FNT- α pelos animais infectados e tratados com a Ptx (Pb+Ptx) no sobrenadante dos macrófagos peritoneiais, verificamos que a produção da citocina no modelo CBA infectado e tratado estava mais elevada do que a dos animais não tratados (grupo Pb) (Figura 14 D, E, F, tabela 7). Ao analisarmos a produção do FNT- α no soro, observamos que estava mais elevada no grupo Pb+Ptx em relação ao grupo controle nos modelos CBA e C57BL6 (Figura 14 B, C, tabela 6), porém não houve modificação para os camundongos BALB/c (Figura 14 A, tabela 6). No sobrenadante dos macrófagos peritoneias, não foi demonstrado diferença significativa na produção do FNT pelos animais infectados em relação aos grupos controles nos três modelos estudados (Figura 14 G, H, I, tabela 7).

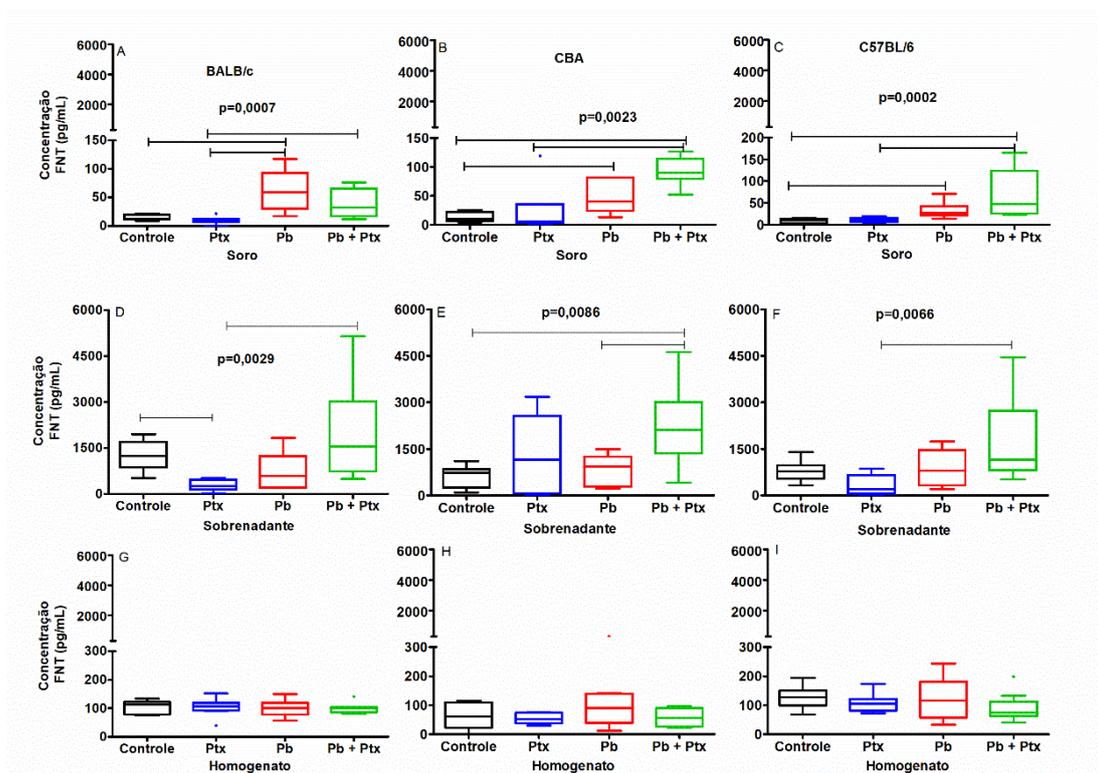


Figura 14- Avaliação do efeito da pentoxifilina na produção de FNT- α no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do tecido cérebral dos camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA no sexto dia da infecção. O FNT- α foi determinado por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: BALB/c, $p = 0,0007^1$. CBA, $p = 0,0023^1$. C57BL/6, $p = 0,0002^1$. Sobrenadante: BALB/c, $p = 0,0029^1$. CBA, $p = 0,0086^1$. C57BL/6, $p = 0,0066^1$. Homogenato: BALB/c, $p = 0,8298^1$. CBA, $p = 0,5243^1$. C57BL/6, $p = 0,3945^2$. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

Quando analisamos comparativamente as concentrações da citocina entre os 3 modelos, verificamos que nos camundongos BALB/c, na situação basal (controle), o FNT- α no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais estava mais elevado que nos outros dois modelos. E no homogenato de tecido cerebral, o C57BL/6 que adoece mais gravemente que o CBA mostrou maior concentração de FNT- α que o CBA. (Figura 15 E,I). Observamos também no homogenato do tecido cerebral, que no modelo CBA, houve menor concentração do FNT- α no grupo Pb+Ptx (Figura 15 L), porém o oposto foi observado no soro (Figura 15 D).

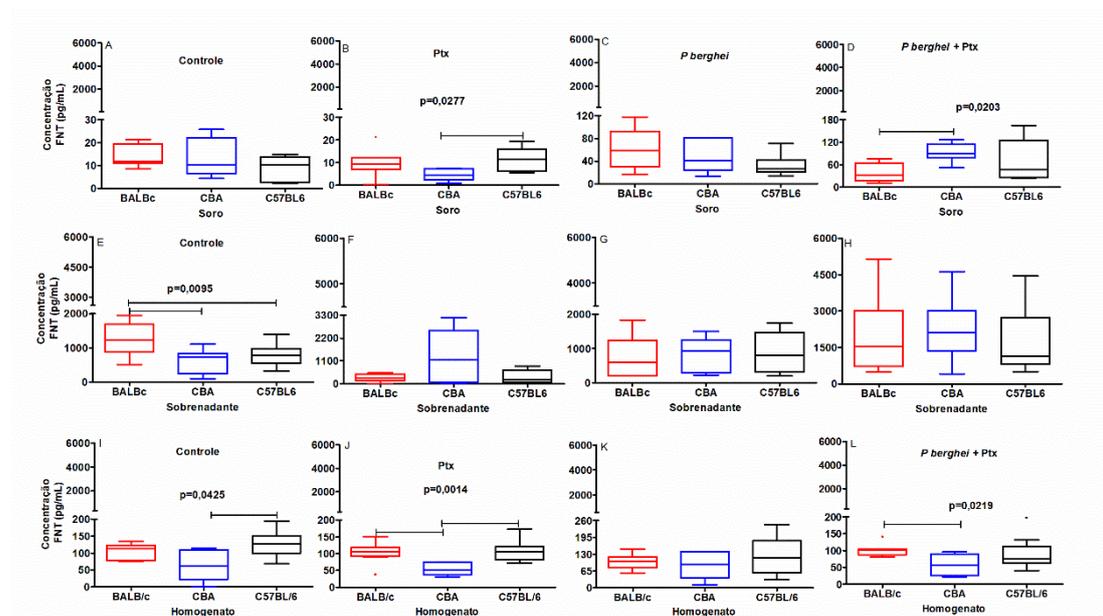


Figura 15 - Comparação do efeito do tratamento com a Ptx na produção de FNT- α nos três modelos estudados, no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. O FNT- α foi determinado por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: Controle, $p = 0,4474^1$. Ptx, $p = 0,0277$. Pb, $p = 0,1484^2$. Pb + Ptx, $p = 0,0203^2$. Sobrenadante: Controle, $p = 0,0095^2$. Ptx, $p = 0,4058^1$. Pb, $p = 0,7525^2$. Pb + Ptx, $p = 0,5444^1$. Homogenato: Controle, $p = 0,0425^1$. Ptx, $p = 0,0014^2$. Pb, $p = 0,8571^1$. Pb + Ptx, $p = 0,0219^1$. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey e teste t

Em conclusão, nossos dados mostraram que a análise da produção do FNT- α foi diferente quando analisado no soro, no sobrenadante das culturas dos macrófagos e no homogenato do tecido cerebral. No soro, nos três modelos, o grupo dos animais infectados pelo plasmódio mostrou maior concentração de FNT- α que o grupo controle. Os animais CBA e C57BL/6 no grupo infectado e tratado com a Ptx também mostraram maior concentração da citocina. No sobrenadante dos macrófagos peritoneais, nos três modelos, o grupo dos animais infectados e tratados com a Ptx apresentou maior concentração da citocina. No homogenato do tecido cerebral não observamos variações na concentração da citocina nos grupos. Pela análise comparativa entre os modelos, na situação basal (grupo controle), o modelo BALB/c apresentou maior concentração do FNT- α no sobrenadante dos macrófagos, entretanto no homogenato do tecido cerebral o C57BL/6 mostrou maior

concentração da citocina. No soro não observamos diferença na concentração basal da citocina entre os modelos. No grupo dos animais infectados também não foi visto diferença na concentração do FNT- α no soro entre os modelos. Todavia no grupo dos animais infectados e tratados com a Ptx, no soro, o CBA mostrou maior concentração da citocina que o BALB/c e no homogenato do cerebro o BALB/c apresentou maior concentração da citocina que o CBA.

5.6.2. Interleucina 6 (IL- 6)

Efeito do tratamento com pentoxifilina na produção da interleucina 6 (IL-6) pelos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA

A IL-6 também é uma citocina inflamatória importante no desenvolvimento da forma cerebral. Para avaliar se havia diferença na produção da IL-6 nos diferentes modelos, analisamos a produção da citocina no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do tecido cerebral, nos 3 modelos estudados.

O grupo dos animais infectados pelo plasmódio (Pb) mostrou maior concentração sérica de IL-6 nos 3 modelos estudados, porém, no CBA esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 16 A, B, C); O grupo dos animais infectados tratados com a Ptx (Pb+Ptx) também apresentou concentração sérica da citocina maior que o grupo controle nos três modelos, todavia não foi estatisticamente significativo para o modelo BALB/c (Figura 16 A, B, C e Tabela 6).

Quando avaliamos no homogenato do tecido cerebral, verificamos nos modelos BALB/c e C57BL/6, que os animais infectados (Pb) e infectados tratados com a droga (Pb+Ptx) apresentaram menor concentração da IL-6 que os animais dos grupos controle e Ptx (Figura 16G, I); O CBA não apresentou variação significativa na concentração de IL-6 no tecido cerebral (Figura 16H e Tabela 8). No sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais, no modelo CBA, os animais com infecção pelo plasmódio mostraram maior concentração da IL-6 que os animais dos grupos controle e Ptx e o tratamento

com a Ptx dos animais infectados contribuiu ainda mais para o aumento na concentração da citocina (Figura 16E), (Tabela 7 e Figura16).

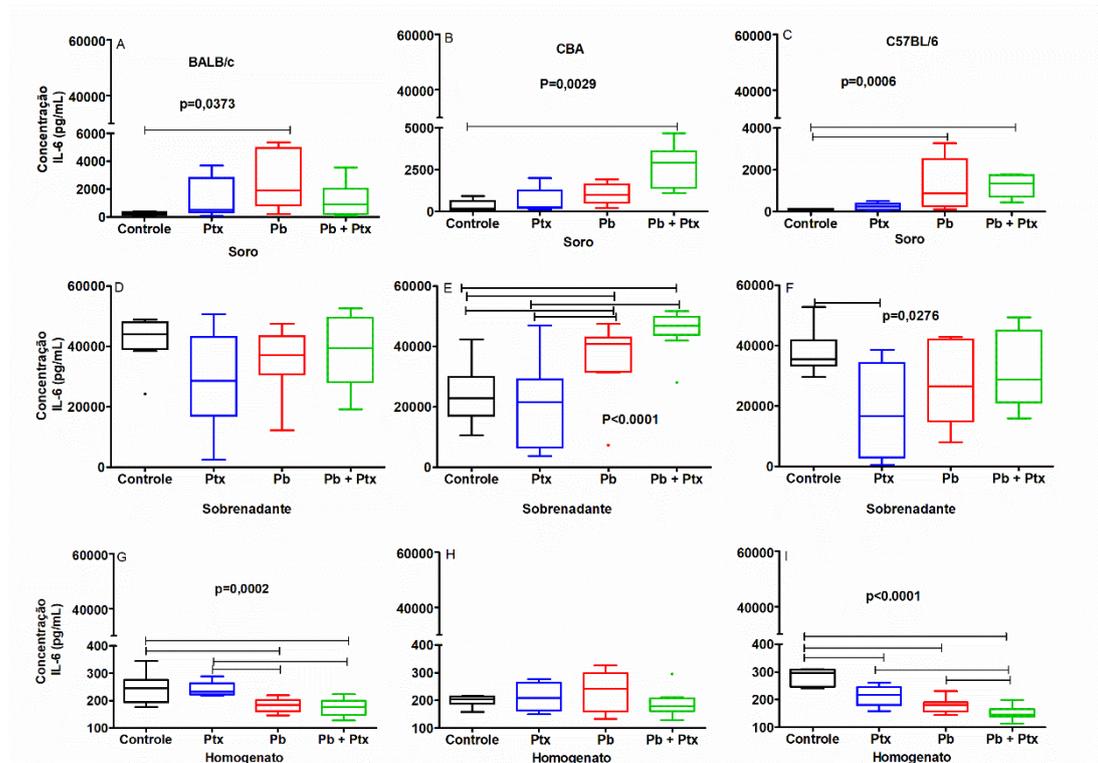


Figura 16- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-6 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados e não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-6 foi avaliada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6 -10 por grupo. Soro: A- BALB/c, $p=0,0373^1$. B- CBA, $p=0,0029^1$. C- C57BL/6, $p=0,0006^1$. Sobrenadante: D- BALB/c, $p=0,1624^2$. E- CBA, $p=0,0001^2$. F- C57BL/6, $p=0,0276^2$. Homogenato: G- BALB/c, $p=0,0002^2$. H- CBA $p=0,3484^2$. I- C57BL/6, $p<0,0001^2$. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey. Obs.: Os eixos do gráfico estão diferentes (soro 6.000, sobrenadante 60.000 e homogenato 400) para melhor caracterizar as diferenças entre os grupos.

Pela análise comparativa entre os 3 modelos, observamos que no soro, no grupo controle o modelo C57BL/6 mostrou menor concentração de IL-6 e o modelo BALB/c a maior (Figura 17 A). No soro dos animais infectados e tratados com a pentoxifilina (Pb+Ptx), o modelo CBA mostrou maior concentração da citocina que os outros dois modelos (Figura 17D). Quando avaliado no tecido cerebral, fisiologicamente (controle), o modelo C57BL/6 apresenta uma concentração de IL-6 maior que o CBA (Figura 17 I). No

sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais, a concentração de IL-6 mostrou uma variação significativa entre os modelos, nos grupos controle e Pb+Ptx, sendo que no grupo controle o CBA teve uma menor concentração da citocina (Figura 17E) e no grupo Pb+Ptx, a maior (Figura 17H).

Em conclusão, a concentração sérica de IL-6, no grupo controle foi menor no modelo C57BL/6 e maior no CBA; a infecção pelo plasmódio elevou a produção sérica de IL-6 nos três modelos; no CBA o tratamento com a Ptx dos animais infectados (Pb + Ptx) contribuiu para aumentar ainda mais a concentração sérica da citocina. Ainda no soro, o grupo Pb+Ptx do modelo CBA mostrou maior concentração da citocina que os outros dois modelos.

Quando analisamos a concentração de IL-6 no homogenato do cérebro e no sobrenadante das culturas dos macrófagos, observamos que no grupo controle, o C57BL/6 que apresentou maior concentração da citocina IL-6, entretanto, observamos o oposto no soro, no qual o modelo CBA apresentou a maior concentração. O grupo infectado e tratado com a Ptx (Pb + Ptx) do modelo CBA mostrou a maior concentração de IL-6 no sobrenadante das culturas dos macrófagos e no soro.

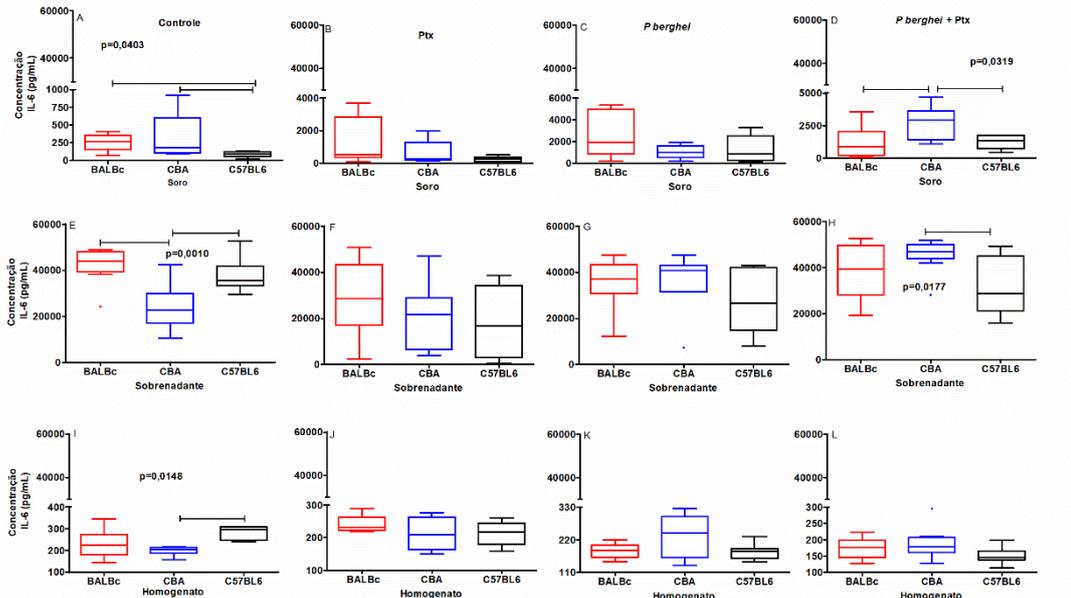


Figura 17- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-6 nos três modelos estudados, no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-6 foi avaliada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6 -10 por grupo. Soro: A- Controle, $p = 0,0403^1$. B- Ptx, $p = 0,1925^1$. C- Pb, $p = 0,1789^1$. D- Pb + Ptx, $p = 0,0319^2$. Sobrenadante: E- Controle, $p = 0,0010^2$. F- Ptx, $p = 0,3921^2$. G-Pb, $p = 0,3065^2$. H- Pb + Ptx, $p = 0,0177^2$. Homogenato: I-Controle, $p = 0,0148^1$. J- Ptx, $p = 0,2347^2$. L- Pb, $p = 0,1786^1$. M- Pb + Ptx, $p = 0,0875^2$. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.6.3. Interferon- γ (IFN- γ)

Efeito do tratamento com pentoxifilina na produção de Interferon-gama (IFN- γ) pelos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

O INF- γ é também uma das principais citocinas envolvidas tanto na imunidade quanto na patogenia das formas graves da malária e é produzido por linfócitos CD4+, CD8+ e NK. Para avaliar seu papel nos diferentes modelos, analisamos a produção da citocina no soro e no homogenato do tecido cerebral, nos 3 modelos estudados.

Nas figuras 18 e 19 estão representados os dados da produção do IFN- γ nos três modelos de estudo. Na situação basal (grupo controle normal) observamos que o modelo BALB/c já tinha a maior produção da citocina, tanto no soro quanto no homogenato do tecido cerebral (Figura 19 A, E). Após a

infecção pelo plasmódio (grupo Pb), todos os modelos mostraram maior produção do INF- γ do que o grupo controle, mas esse aumento não foi significativo para o modelo CBA (Figura 18). Observamos que no modelo BALB/c, tanto de modo sistêmico como localmente no cérebro, os animais com infecção pelo plasmódio apresentaram maior produção do INF- γ e após tratamento com a Ptx dos animais infectados (Pb+Ptx) não houve modificação estatisticamente significativa da produção da citocina (Figura 18 A, D). Após o tratamento com a PTX (grupo Pb+Ptx) observamos no soro que no modelo CBA, a Ptx induziu maior produção do IFN- γ (Figura 18 C), no modelo C57BL/6 não houve modificação da produção da citocina (Figura 18 D). Dados nas tabelas 6, 7, 8 e figuras 18 e 19.

Em conclusão, nossos dados mostraram que nos três modelos a infecção pelo plasmódio aumentou a concentração de INF- γ , tanto no soro quanto no homogenato do cérebro. Os três modelos responderam de forma distinta ao tratamento com a Ptx pelos animais infectados em relação à produção do INF- γ , no CBA o tratamento dos animais infectados aumentou ainda mais a concentração do INF- γ e nos modelos BALB/c e C57BL/6 o tratamento dos animais infectados não modificou o aumento da concentração de INF- γ ocasionado pela infecção.

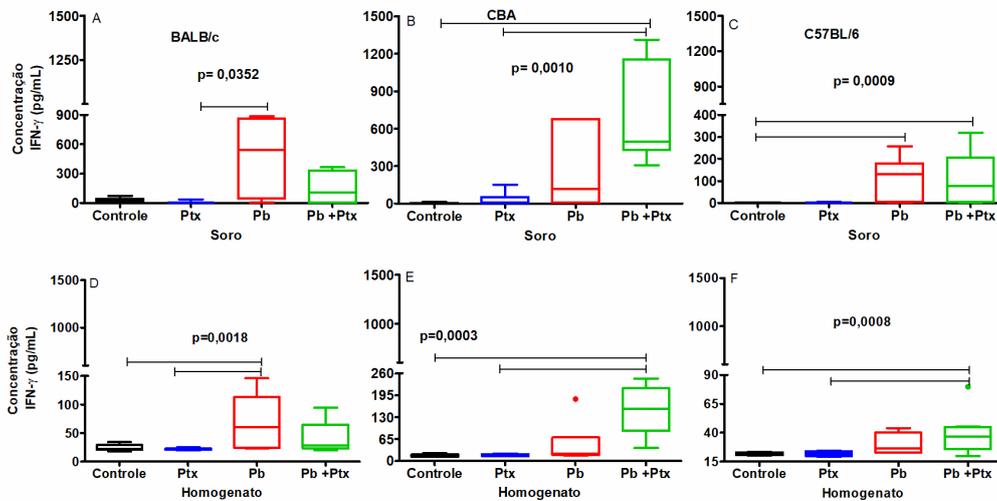


Figura 18 - Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de INF- γ no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. O INF- γ foi determinado por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: BALB/c, p = 0,0352; CBA, p = 0,0010; C57BL/6, p = 0,0009. Homogenato: BALB/c, p = 0,0018; CBA, p = 0,0003; C57BL/6, p = 0,0008. Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os valores estão expressos como mediana / intervalo interquartil, Valor de p significativo quando <0,05. Abreviaturas: Ptx, pentoxifilina; Pb, *Plasmodium berghei*.

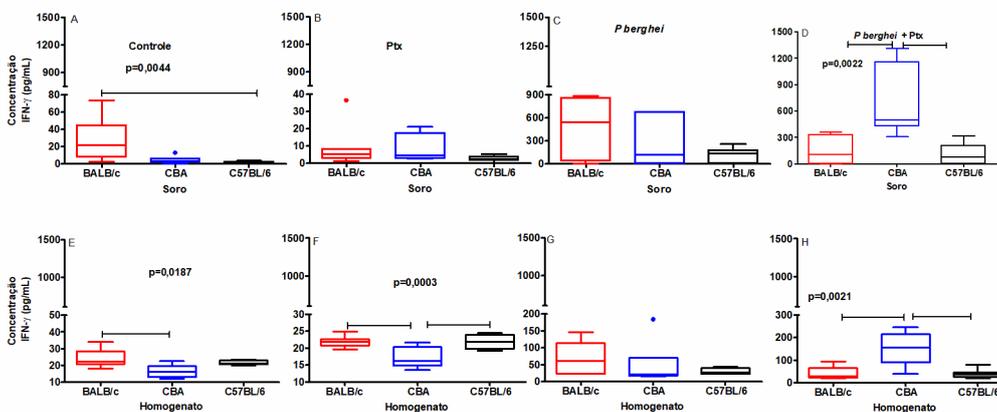


Figura 19 - Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de INF- γ nos três modelos estudados, no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. O INF- γ foi determinado por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: A-Controle, p = 0,0044¹. B- Ptx, p = 0,0857¹. C- Pb, p = 0,1974¹. D- Pb + Ptx, p = 0,0022¹. Homogenato: I-Controle, p = 0,0187¹. J- Ptx, p = 0,0003². L- Pb, p = 0,2246¹. M- Pb+Ptx, p = 0,0021¹. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os valores estão expressos como mediana / intervalo interquartil, Valor de p significativo quando <0,05. Abreviaturas: Ptx, pentoxifilina; Pb, *Plasmodium berghei*.

5.6.4. Interleucina 12 (IL-12p70)

Efeito do tratamento com pentoxifilina na produção de interleucina 12p70 (IL-12-p70) pelos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA

A IL-12 é produzida pelos macrófagos e é fundamental para indução da resposta de LT CD4⁺, e para desviar o ramo da resposta imune para o padrão T auxiliar do tipo 1. Esse tipo de resposta tem um papel importante na resposta inflamatória, pois quando ativada estimula a produção do FNT- α e de INF- γ . Para avaliar seu papel nos diferentes modelos, analisamos a produção da citocina no soro, na cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do tecido cerebral, nos 3 modelos estudados.

As diferenças foram mais evidentes quando a citocina foi quantificada no homogenato do tecido cerebral. A infecção pelo plasmódio induziu no tecido cerebral aumento da produção da IL-12 nos modelos BALB/c e C57BL/6 (Figura 20 G,I). O tratamento dos animais infectados (Pb+Ptx) não modificou significativamente a produção da IL-12 nos três modelos (Figura 20 G,H I).

Pela comparação entre os grupos, no homogenato do tecido cerebral, após a infecção pelo plasmódio (GrupoPb) o modelo C57BL/6 produziu maior quantidade da citocina do que o modelo BALB/c (Figura 21 K e Tabela 6, 7 e 8).

Em conclusão, no homogenato do tecido cerebral a infecção pelo plasmódio modulou a produção de IL-12 nos modelos BALB/c e C57BL/6, que mostraram aumento na concentração da citocina no grupo Pb e a Ptx não influenciou a produção dessa citocina no grupo infectado. O modelo C57BL/6 produziu maior quantidade da citocina do que os outros dois modelos.

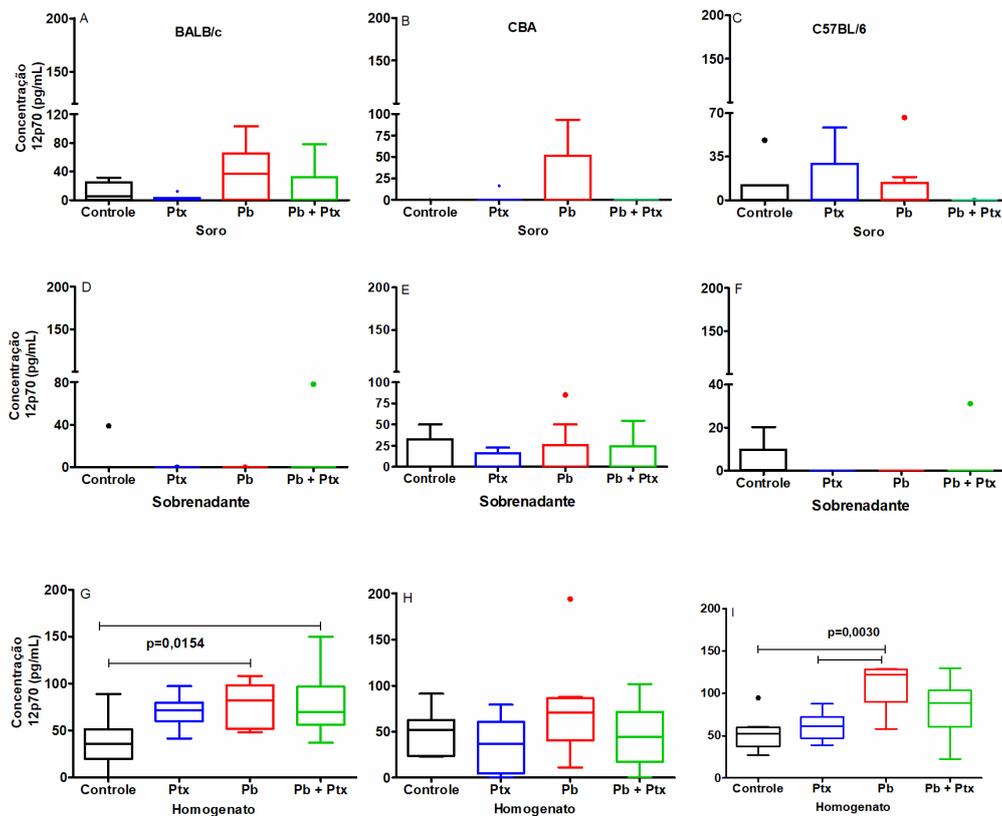


Figura 20 - Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-12p70 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-12p70 foi avaliada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: A- BALB/c, $p=0,1921^1$. B- CBA, $p=0,7887^1$. C- C57BL/6, $p=0,5577^1$. Sobrenadante: D- BALB/c, $p=0,9990^1$. E- CBA, $p=0,9969^1$. F- C57BL/6, $p=0,8191^1$. Homogenato: G- BALB/c, $p=0,0154^2$. H- CBA, $p=0,4435^1$. I- C57BL/6, $p=0,0030^1$. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

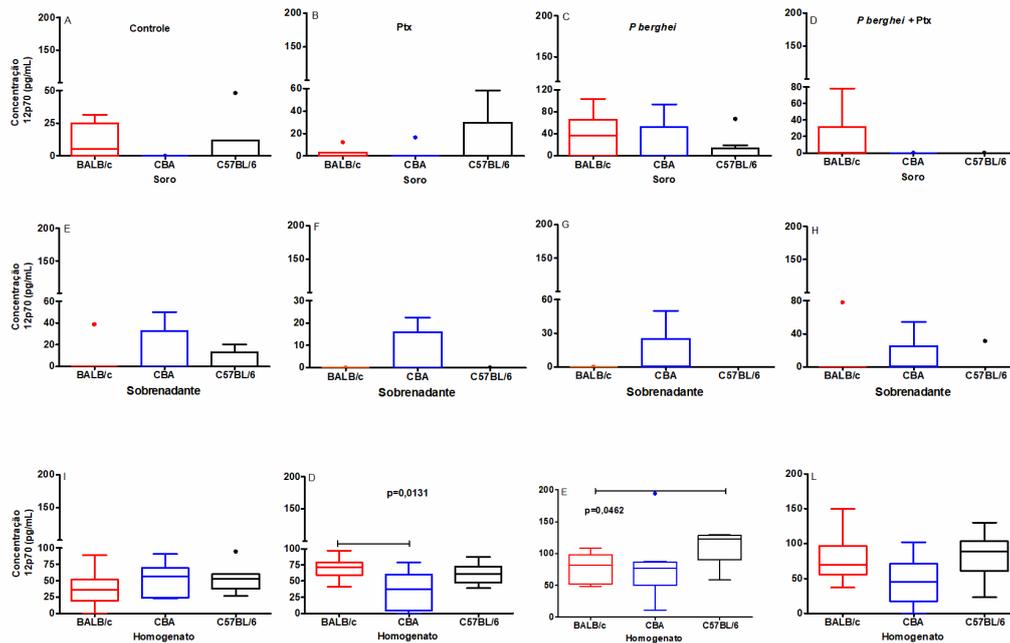


Figura 21- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-12 p70 nos três modelos estudados, no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-12 p70 foi feita por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6 -10 por grupo. Soro: A- Controle, $p=0,3503^1$. B- Ptx, $p=0,2712^1$. C- Pb, $p=0,2416^1$. D- Pb + Ptx, $p=0,3306^1$. Sobrenadante: E- Controle, $p=0,7402^1$. F- Ptx, $p=0,2926^1$. G-Pb, $p=0,4856^1$. H- Pb + Ptx, $p=0,5128^1$. Homogenato: I-Controle, $p=0,4131^2$. J- Ptx, $p=0,0131^2$. L- Pb, $p=0,0462^1$. M- Pb + Ptx, $p=0,0615^2$. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.6.5. Interleucina 10 (IL-10)

Efeito do Tratamento com pentoxifilina na produção de interleucina - 10 (IL-10) pelos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

A IL-10 é fundamental para regular a resposta imune e é produzida por várias células da imunidade inata e adaptativa, entre elas, os macrófagos e os LT CD4⁺, principalmente quando desviados para o ramo T auxiliar do tipo 2, pelos linfócitos B, células NK e células dendríticas. A resposta Tauxiliar 2 modula a resposta inflamatória, pois inibe o ramo T auxiliar do tipo 1, diminuindo a produção do FNT- α e do INF- γ . Para avaliar seu papel nos diferentes modelos, analisamos a produção da citocina no soro, na cultura dos

macrófagos peritoneais e no homogenato do tecido cerebral, nos 3 modelos estudados.

Os dados da produção da IL-10 estão mostrados nas Figuras 22 e 23. A infecção pelo plasmódio promoveu aumento da concentração de IL-10 no soro dos animais do modelo BALB/c (Figura 22A). No modelo CBA o grupo Pb+Ptx mostrou maior concentração de IL-10 que o grupo Pb (Figura 22B). No sobrenadante dos macrófagos peritoneais a infecção pelo Pb aumentou a concentração de IL-10 no modelo CBA e o tratamento com a Ptx não modificou essa produção (Figura 22E). No homogenato do tecido cerebral no modelo CBA a infecção pelo Pb promoveu maior concentração de IL-10 e o tratamento com a Ptx dos animais infectados diminuiu esse aumento (Figura 22H).

Observamos que no sobrenadante das culturas dos macrófagos, na situação basal (grupo controle normal), o modelo CBA produziu menor quantidade da IL-10 do que os outros dois modelos (CBA e C57BL/6). (Figura 23 E). Entretanto, no homogenato do tecido cerebral, na infecção pelo plasmódio, o modelo CBA apresentou uma resposta oposta, sendo que produziu maior quantidade da IL-10 do que os outros dois modelos após a infecção (Figura 23 K). Os dados do soro estão na tabela 6, do sobrenadante na 7, e do homogenato na 8.

Em conclusão nossos dados mostraram que no sobrenadante dos macrófagos peritoneais do BALB/c o grupo controle apresentou maior concentração de IL-10, porém quando esses animais foram infectados pelo plasmódio, a concentração da IL-10 no homogenato do cérebro foi a menor. A Ptx não influenciou a produção da IL-10.

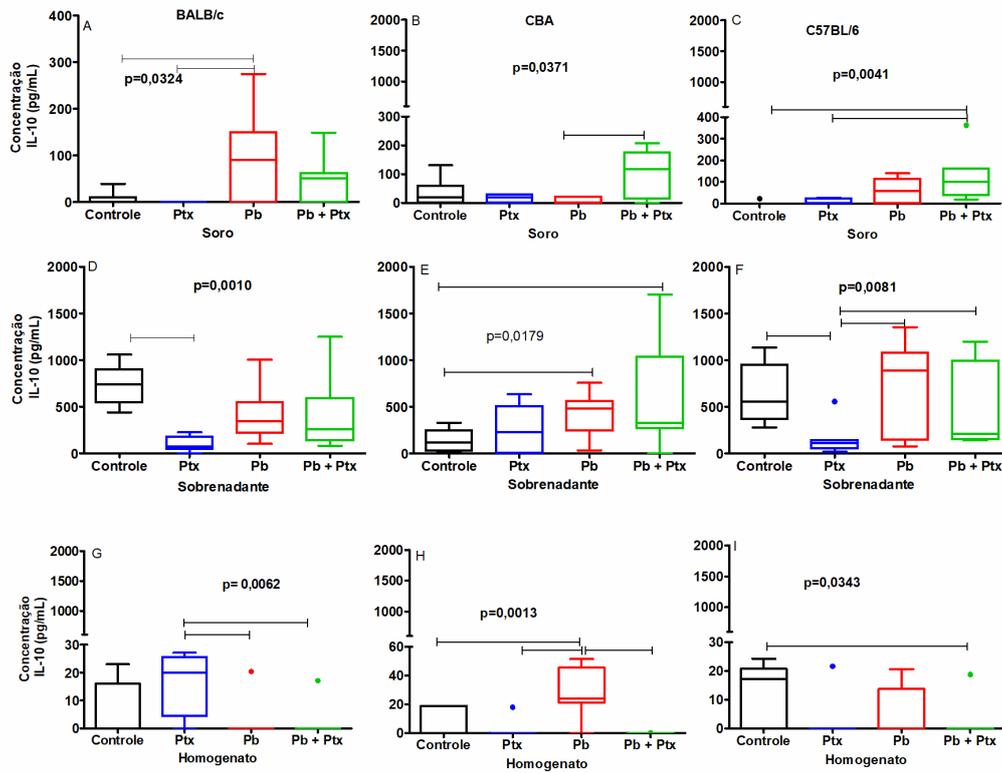


Figura 22- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-10 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-10 foi avaliada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: A - BALB/c, $p=0,0324$. B - CBA, $p=0,0773$. C - C57BL/6, $p=0,0041$. Sobrenadante: D - BALB/c, $p=0,0010$. E - CBA, $p=0,0946$. F - C57BL/6, $p=0,0081$. Homogenato: G - BALB/c, $p=0,0062$. H - CBA $p=0,0013$. I - C57BL/6, $p=0,2449$. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

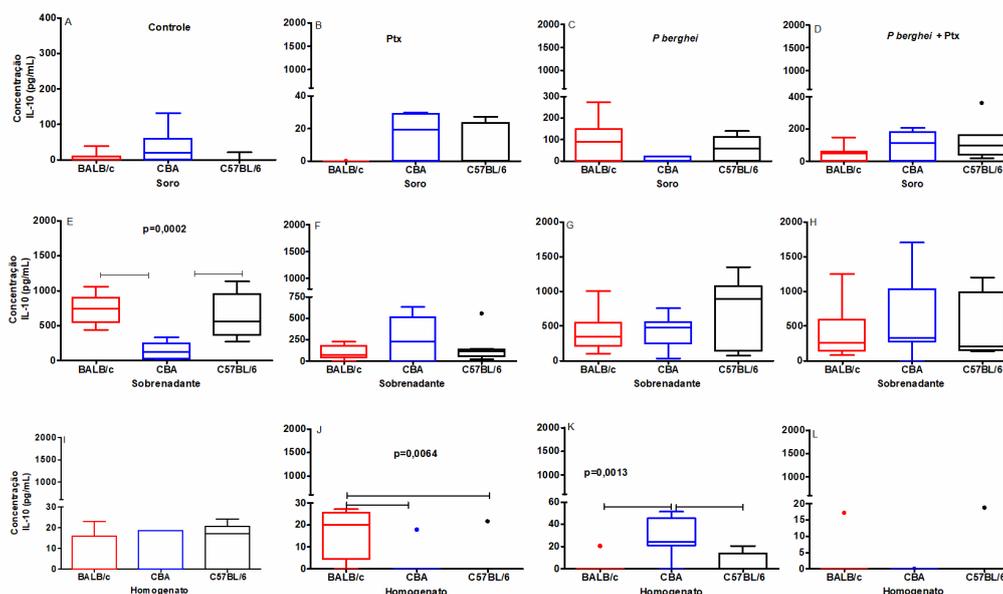


Figura 23- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-10 nos três modelos estudados, no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-10 foi avaliada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: A- Controle, $p=0,1272^1$. B- Ptx, $p=0,1421^1$. C- Pb, $p=0,2569^1$. D- Pb + Ptx, $p=0,2082^2$. Sobrenadante: E- Controle, $P=0,0022^2$. F- Ptx, $p=0,7853^1$. G-Pb, $P=0,3164^2$. H- Pb + Ptx, $p=0,4020^1$. Homogenato: I-Controle, $p=0,5649^1$. J- Ptx, $p=0,0064^1$. L- Pb, $p=0,0013^1$. M- Pb + Ptx, $p=0,9943^1$. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.6.6. Interleucina 2 (IL-2)

Efeito do tratamento com pentoxifilina na produção da interleucina-2 (IL-2) pelos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados e ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

A IL-2 é produzida pelos linfócitos após estímulo e tem um papel primordial na multiplicação dessas células. Para avaliar seu papel nos diferentes modelos, analisamos a produção da citocina no soro e no homogenato do tecido cerebral, nos 3 modelos estudados.

A produção da IL-2 foi melhor evidenciada no homogenato do tecido cerebral (Figuras 24 e 25). Na situação basal, no grupo controle normal, no homogenato do tecido cerebral, observamos que o modelo CBA estava produzindo a menor quantidade da citocina e o modelo C57BL/6 a maior quantidade da IL-2 (Figura 25 E). Entretanto, após a infecção pelo plasmódio,

observamos resultado oposto, sendo que o modelo CBA que produziu a maior quantidade da IL-2 (Figura 25 G). Tabela 6.

No homogenato do tecido cerebral, a infecção pelo plasmódio ocasionou nos modelos BALB/c e C57BL/6 uma menor produção da IL-2 (Figura 24 D,F), ocorrendo o oposto no modelo CBA, no qual a infecção pelo plasmódio produziu um aumento na produção da IL-2 (Figura 24 E). O tratamento com a Ptx dos animais infectados (Pb+Ptx) produziu uma diminuição da IL-2 nos modelo CBA (Figura 24 E), mas não alterou o efeito da infecção na produção da IL-2 nos modelos BALB/c e C57BL/6 (Figura 24 D, F). Tabelas 6,7,8.

Em conclusão, as diferenças nas respostas nos três modelos ficou mais claramente evidenciada no homogenato do tecido cerebral. Embora os camundongos CBA tenham mostrado a menor concentração da citocina na situação basal, houve uma maior concentração da citocina nos animais infectados pelo plasmódio. O tratamento com a Ptx dos animais infectados (Pb+Ptx) produziu uma diminuição da IL-2 nos modelos CBA e C57BL/6, mas não alterou o efeito da infecção na produção da IL-2 no modelo BALB/c.

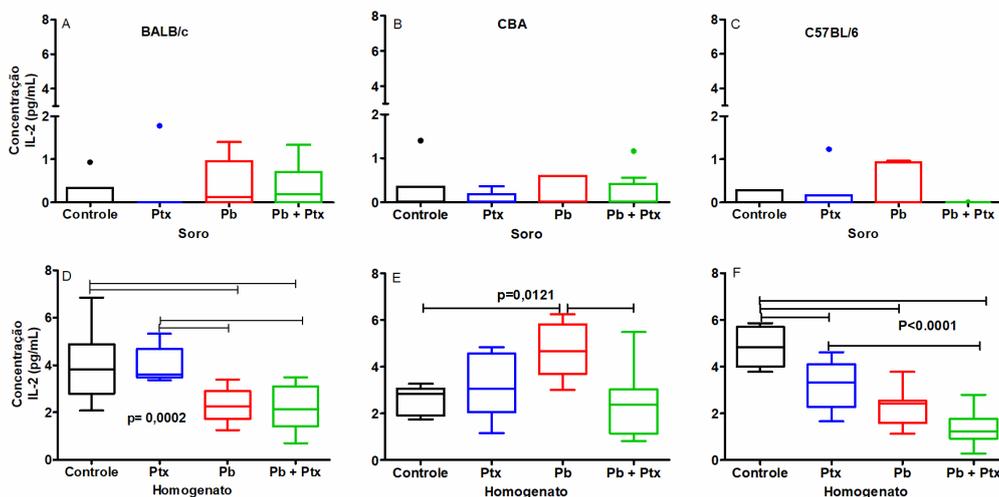


Figura 24 - Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-2 no soro e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-2 foi determinada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: A- BALB/c, $p=0,5037^1$. B- CBA, $p=0,9624^1$. C- C57BL/6, $p=0,5380^1$. Homogenato: G- BALB/c, $p=0,0002^2$. H- CBA, $p=0,0121^2$. I- C57BL/6, $p<0.0001^2$. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

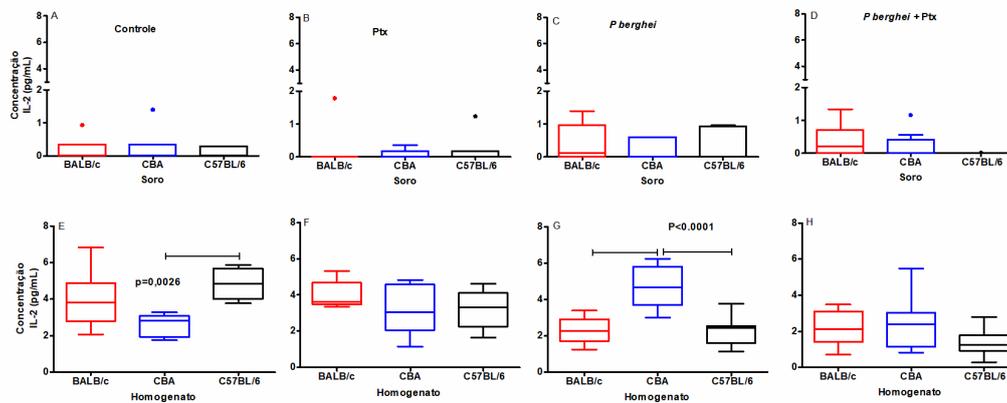


Figura 25 - Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-2 nos três modelos estudados, no soro e no homogenato do cérebro dos camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-2 foi avaliada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: A-Controle, $p=0,9103^1$. B- Ptx, $p=0,889^1$. C- Pb, $p=0,6087^1$. D- Pb + Ptx, $p=1535^1$. Homogenato: I-Controle, $p=0,0026^2$. J- Ptx, $p=0,2463^2$. L- Pb, $p<0.0001^2$. M- Pb + Ptx, $p=0,0854^2$. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.6.7. Interleucina 4 (IL-4)

Efeito do tratamento com pentoxifilina na produção de interleucina 4 (IL-4), pelos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

A IL-4 é a principal citocina produzida pelos linfócitos CD4⁺ T auxiliar do tipo 2, quando da ativação dos linfócitos. Para avaliar seu papel nos diferentes modelos, analisamos a produção da citocina no soro e no homogenato do tecido cerebral, nos 3 modelos estudados.

A produção da IL-4 ocorreu em níveis baixos tanto no soro, quanto no homogenato do tecido cerebral (Figura 26 e 27). Após a infecção pelo plasmódio, observamos que houve uma maior produção da IL-4 no homogenato do tecido cerebral pelos camundongos CBA (Figura 26E). A Ptx determinou um aumento na produção da IL-4 somente no soro dos animais infectados (Pb+Ptx) do modelo BALB/c (Figura 26 A). E nesse grupo (Pb+Ptx), no soro, o modelo BALB/c produziu a maior quantidade da IL-4 e o modelo C57BL/6 a menor (Figura 27D). (Tabela 8).

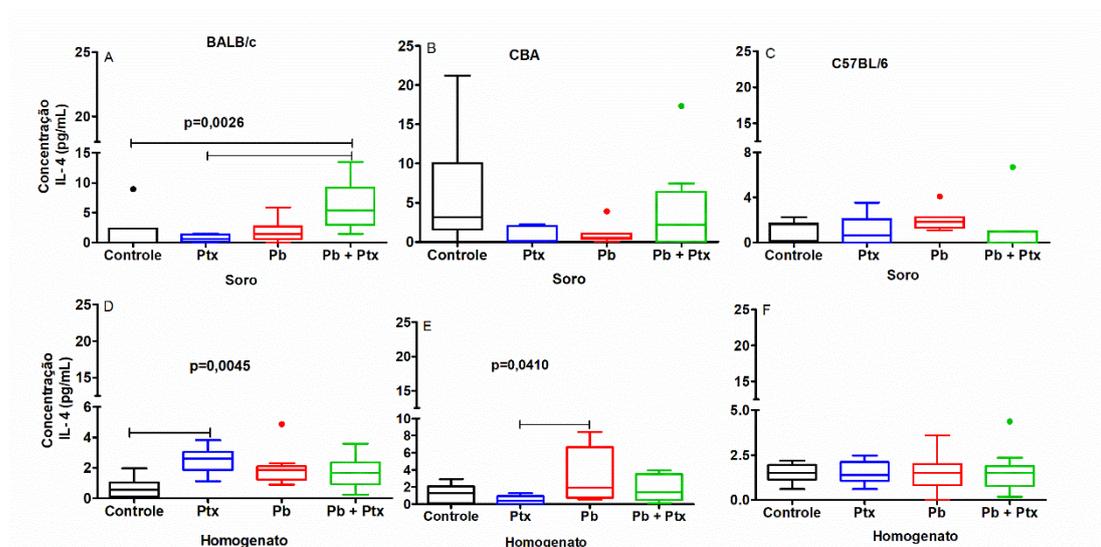


Figura 26- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-4 no soro, e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-4 foi mensurada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6 -10 por grupo. Soro: A- BALB/c, p=0,0026¹. B- CBA, p=0,2637¹. C- C57BL/6, p=0,0953¹. Homogenato: G- BALB/c: p=0,0045¹. H- CBA: p=0,0410¹. I- C57BL/6: p=0,9921². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

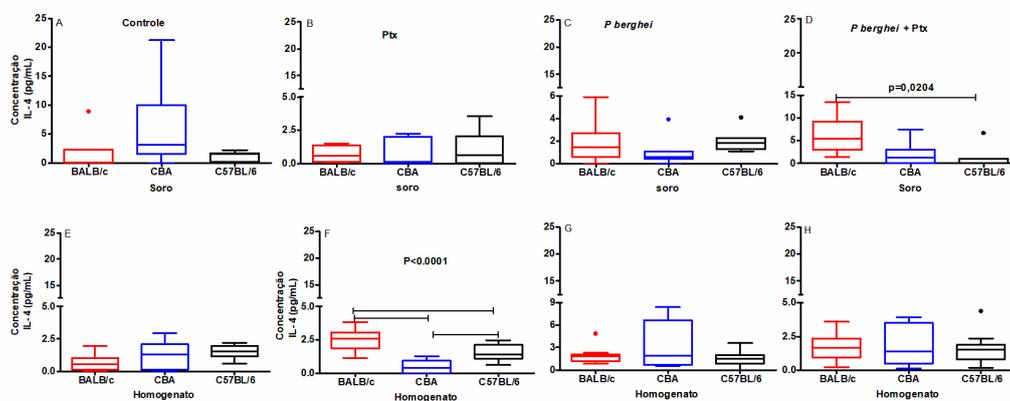


Figura 27- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-4 nos três modelos estudados, no soro e no homogenato do cérebro dos camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-4 foi mensurada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: A-Controle, p= 0,0695¹. B- Ptx, p= 0,7433². C- Pb, p= 0,0899¹. D- Pb + Ptx, p= 0,0204¹. Homogenato: I-Controle, p= 0,1283². J- Ptx, P<0.0001². L- Pb, p= 0,7617¹. M- Pb + Ptx, p= 0,9302². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.6.8. Interleucina 17A (IL- 17A)

Efeito do tratamento com pentoxifilina na produção de interleucina-17A (IL-17A) pelos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

A IL-17A é também um mediador da inflamação e é produzida principalmente pelos linfócitos T CD4+ quando, após ativação, são desviados para o ramo T auxiliar 17, mas pode ser produzida por várias outras células da imunidade inata e pelos LTCD8+. Tem um papel importante na defesa contra patógenos extracelulares. Para avaliar seu papel nos diferentes modelos, analisamos a produção da citocina no soro e no homogenato do tecido cerebral, nos 3 modelos estudados.

As figuras 28 e 29 e a Tabela 8 mostram os resultados da IL-17A. No soro observamos diferença na concentração de IL-17A entre os grupos apenas no modelo BALB/c, sendo que os grupos Pb e Pb+ Ptx mostraram maior concentração da citocina (Figura 28A). No homogenato do tecido cerebral a infecção pelo plasmódio provocou aumento na concentração da IL17A nos modelos BALB/c e C57BL/6 (Figura 28D,F).

Na situação basal (controle normal), no homogenato do tecido cerebral, observamos que o modelo C57BL/6 produziu maior quantidade da IL-17A do que o modelo BALB/c (Figura 29E). Após a infecção com o plasmódio (Pb), verificamos no homogenato do tecido cerebral, que o modelo C57BL/6 produziram uma quantidade maior da IL-17A do que o modelo BALB/c (Figura 29G) e após o tratamento dos animais infectados o C57BL/6 mostrou maior concentração que o modelo CBA (Figura 29H). No soro, houve menor produção da IL-17A no modelo C57BL/6 do que no modelo BALB/c pelos grupos Pb e Pb + Ptx (Figura 29C e D).

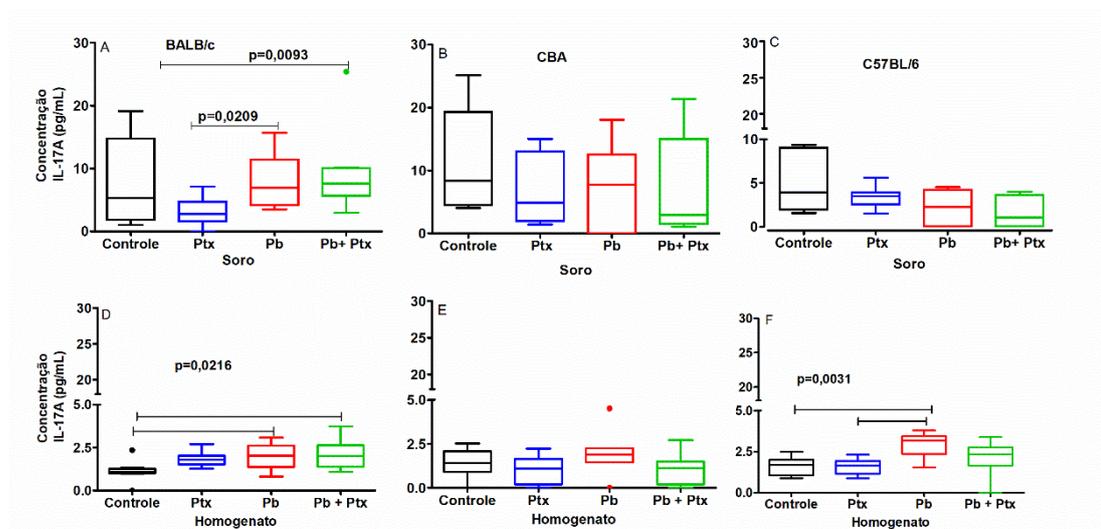


Figura 28- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-17A no soro e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-17A foi avaliada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6-10 por grupo. Soro: A- BALB/c, p=0,0638¹. B- CBA, p=0,5735¹. C- C57BL/6, p= 0,0514². Homogenato: G- BALB/c: p= 0,0216¹. H- CBA: p=0,2184². I- C57BL/6: P=0,0031². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey. Soro: BALB/c, p=0,0093, teste de Mann Whitney e p= 0,0209, teste t.

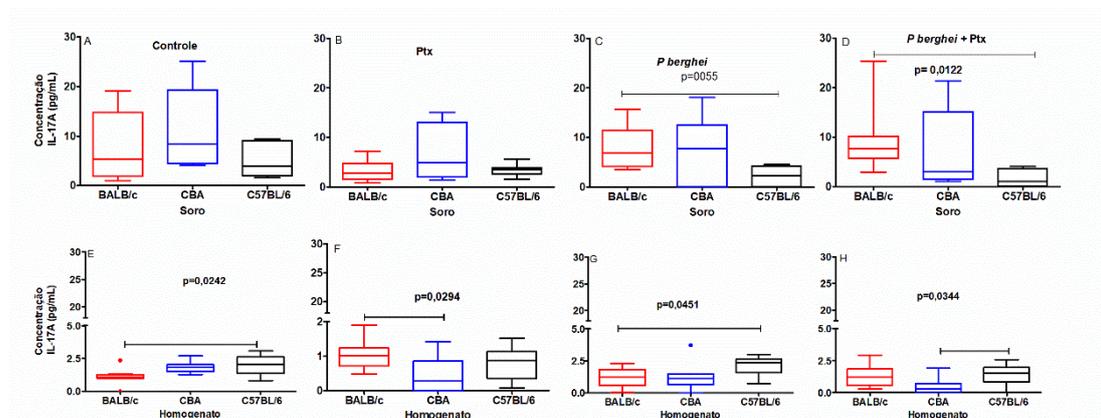


Figura 29- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de IL-17A nos três modelos estudados, no soro e no homogenato do cérebro dos camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A IL-17A foi avaliada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6 - 10 por grupo. Soro: A-Controle, p = 0, 0,2308². B- Ptx, p = 0,6255¹. C- Pb, p = 0,0592¹. D- Pb+Ptx, p = 0,0122¹. Homogenato: E-Controle, p = 0,0242¹. F- Ptx, p = 0,0702². G- Pb, p = 0,0451¹. H- Pb+Ptx, p = 0,0344². Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey. Soro: C- Pb (BALB/c X C56BL/6), p = 0,0055, teste t. Homogenato: F- Ptx (BALB/c X CBA), p = 0,0294, teste t, G- Pb (BALB/c X C56BL/6), p = 0,0229, teste t. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

5.6.9. Quimiocina CCL2 (MCP-1)

Efeito do Tratamento com pentoxifilina na produção de quimiocina CCL2 (MCP-1) pelos camundongos do modelos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

O MCP-1 (CCL2) é uma quimiocina importante que regula a migração de células e estimula fortemente a migração de monócitos para os sítios de lesão, que é uma das células que produz as citocinas inflamatórias envolvidas nas lesões da forma cerebral da malária. Para avaliar seu papel nos diferentes modelos, analisamos a produção da quimiocina no soro, no sobrenadante dos macrófagos peritoneais e no homogenato do tecido cerebral, nos 3 modelos estudados.

As Figuras 30 e 31 e as Tabelas 6, 7, 8 mostram os dados do MCP-1. No sobrenadante das culturas dos macrófagos, observamos que na situação basal (controle normal), o modelo C57BL/6 produziu a maior quantidade da quimiocina e o modelo CBA a menor (Figura 31E). Já no grupo dos animais infectados e tratados com a Ptx, o BALB/c mostrou maior concentração da quimiocina que o modelo CBA (Figura 31H). No soro, no grupo Pb, o modelo BALB/c mostrou maior concentração de MCP-1 que o modelo C57BL/6 (Figura 31C), entretanto após o tratamento dos animais infectados o CBA apresentou maior concentração que os outros dois modelos (Figura 31D). No homogenato do tecido cerebral observamos diferença entre os modelos apenas no grupo Pb+Ptx, sendo que o CBA mostrou maior concentração de MCP-1 e o BALB/c a menor (Figura 31L). A infecção pelo plasmódio induziu uma maior produção do MCP-1 nos modelos BALB/c e CBA no homogenato do tecido cerebral (Figura 30 G,H). No grupo Pb+Ptx, observamos no soro, que houve uma grande produção do MCP-1 pelo modelo CBA (Figura 30B). Entretanto, no sobrenadante das culturas dos macrófagos observamos que o tratamento com a Ptx diminuiu o MCP-1 (Pb+Ptx) (Figura 30E).

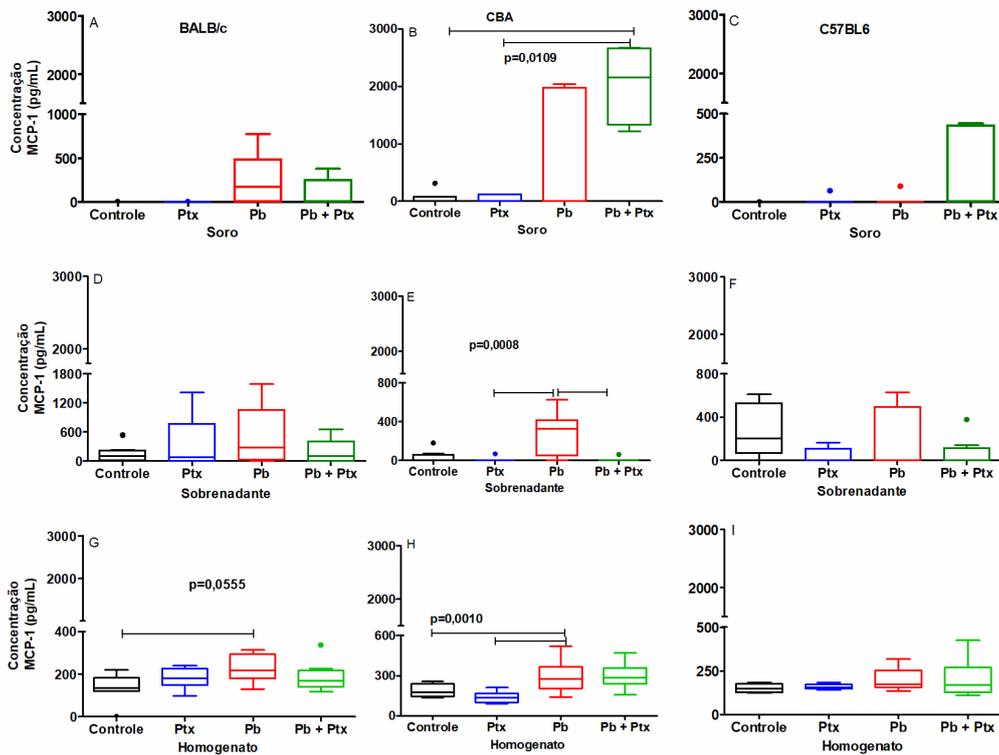


Figura 30 - Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de MCP-1 no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A MCP-1 foi avaliada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6 - 10 por grupo. Soro: A- BALB/c, $p = 0,0870$. B- CBA, $p = 0,0109$. C- C57BL/6, $p = 0,7906$. Sobrenadante: D- BALB/c, $p = 0,5894$. E- CBA, $p = 0,0008$. F- C57BL/6, $p = 0,0846$. Homogenato: G- BALB/c: $p = 0,0555$. H- CBA: $p = 0,0010$. I- C57BL/6: $p = 0,3554$. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

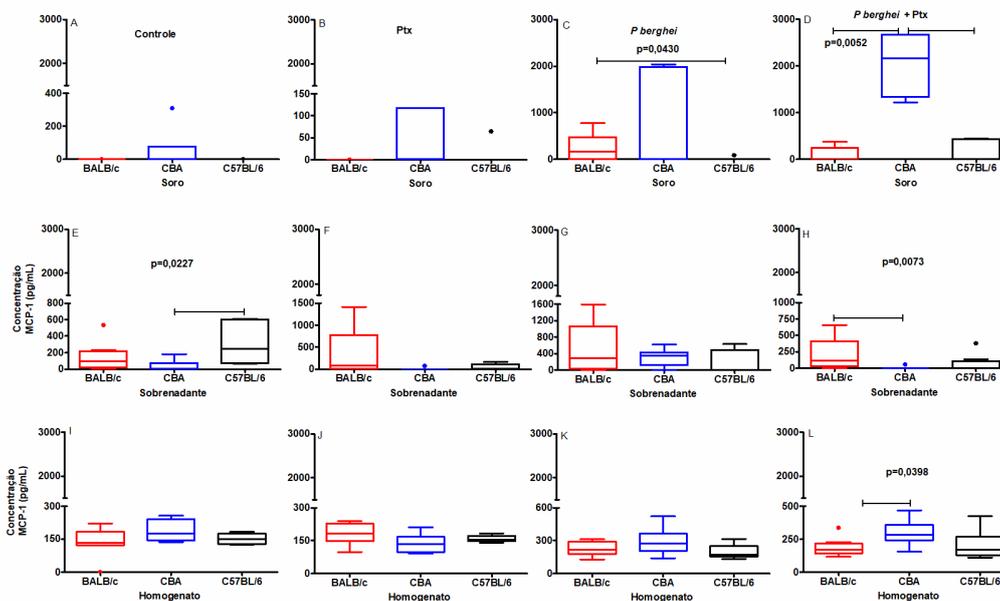


Figura 31- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção de MCP-1 nos três modelos estudados, no soro, no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais e no homogenato do cérebro dos camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. A MCP-1 foi avaliada por citometria de fluxo (Kit CBA). n de 6 - 10 por grupo. Soro: A-Controle, p = 0,9896¹. B- Ptx, p = 0,6175¹. C- Pb, p = 0,1479¹. D- Pb+Ptx, p = 0,0052¹. Sobrenadante: E- Controle, p = 0,0227¹. F- Ptx, p = 0,1320¹. G-Pb, p = 0,2621¹. H- Pb+Ptx, p = 0,0073¹. Homogenato: I-Controle, p = 0,1841¹. J- Ptx, p = 0,0671¹. L- Pb, p = 0,0978². M- Pb+Ptx, p = 0,0398². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey. Soro: C- Pb, p=0,0430, teste de Mann Whitney.

Tabela 6 – Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção das citocinas FNT- α , IL-6, INF, IL-12, IL-10, IL-2, IL-4, IL-17A e da quimiocina CCL2 (MCP-1) no soro dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados e ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, concentração expressa em pg/mL.

Grupos Soro	Controle	Ptx	Pb	Pb + Ptx	Valor de p
BALB/c					
FNT- α	11,94 (10,97 – 19,47)	9,260 (6,990 – 12,20)	58,92 (30,20 – 92,37)	32,46 (16,82 – 65,09)	K-W/ 0,0007
IL-6	261,5 (151,2 – 354,0)	494,4 (321,1 – 2821)	1931 (831,7 – 4946)	897,8 (203,7 – 2033)	K-W/ 0,0373
INF γ	21,43 (8,295 – 44,72)	5,200 (2,710 – 8,330)	542,6 (41,93 – 859,6)	109,5 (4,870 – 332,2)	K-W/ 0,0352
IL-12	5,515 (0,0 – 25,04)	0,0 (0,0 – 3,030)	36,53 (0,0 – 64,75)	0,0 (0,0 – 31,58)	K-W/ 0,1921
IL-10	0,0 (0,0 – 9,610)	0,0 (0,0 – 0,0)	90,73 (0,0 – 149,2)	51,00 (0,0 – 61,37)	K-W/ 0,0324
IL-2	0,0 (0,0 – 0,3375)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,1250 (0,0 – 0,9550)	0,2000 (0,0 – 0,7000)	K-W/ 0,5037
IL-4	0,0 (0,0 – 2,320)	0,6100 (0,1100-1,390)	1,450 (0,5275– 2,683)	5,410 (2,918 – 9,170)	K-W/ 0,0026
IL-17A	5,305 (1,843 – 14,75)	2,810 (1,610 – 4,710)	6,920 (4,130 – 11,40)	7,605 (5,630 – 10,08)	K-W/ 0,0638
MCP-1	0,0 (0,0 – 0,0025)	0,0 (0,0 – 0,0)	173,4 (0,0 – 481,4)	0,0 (0,0 – 249,7)	K-W/ 0,0870
CBA					
FNT- α	14,44 (6,495 – 22,08)	5,700 (3,215 – 35,27)	40,77 (23,77 – 81,21)	89,99 (79,02 – 114,0)	K-W/ 0,0023
IL-6	180,7 (101,7 – 604,8)	233,9 (179,0 – 1247)	982,5 (512,9 – 1610)	2911 (1393 – 3605)	K-W/ 0,0029
INF- γ	3,015 (1,815 – 6,035)	9,130 (3,148 – 53,71)	117,2 (5,650 – 677,0)	496,9 (426,9 – 1155)	K-W/ 0,0010
IL-12	0,0 (0,0 – 0,0025)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 51,55)	0,0 (0,0 – 0,0)	K-W/ 0,7887
IL-10	19,47 (0,0 – 59,06)	19,23 (0,0 – 28,97)	0,0 (0,0 – 20,65)	117,9 (13,72 – 174,8)	K-W/ 0,0773
IL-2	0,0 (0,0 – 0,3500)	0,0 (0,0 – 0,18)	0,0 (0,0 – 0,5900)	0,0 (0,0 – 0,4200)	K-W/ 0,9624
IL-4	3,170 (1,598 – 10,04)	0,11 00 (0,0 – 2,015)	0,5500 (0,3900 – 1,060)	2,160 (0,0 – 6,375)	K-W/ 0,2637
IL-17A	8,410 (4,465 – 19,30)	4,880 (1,1950 – 13,01)	7,750 (0,0 – 12,56)	2,955 (1,498 – 15,05)	K-W/ 0,5735
MCP-1	0,0 (0,0 – 77,75)	0,0 (0,0 – 117,2)	0,0 (0,0 – 1979)	2653 (1441 – 4170)	K-W/ 0,0109

C57BL/6					
FNT- α	10,42 (2,620 – 13,77)	11,37 (6,000 – 15,85)	26,83 (20,72 – 41,80)	47,24 (24,91 – 124,2)	K-W/ 0,0002
IL-6	90,11 (54,69 – 121,6)	237,0 (90,39 – 356,3)	862,0 (252,6 – 2516)	1348 (711,8 – 1737)	K-W/ 0,0006
INF- γ	0,0 (0,0 – 2,200)	2,230 (1,940 – 3,690)	131,7 (3,400 – 179,4)	78,05 (4,950 – 205,8)	K-W/ 0,0009
IL-12	0,0 (0,0 – 12,04)	0,0 (0,0 – 29,36)	0,0 (0,0 – 13,94)	0,0 (0,0 – 0,0)	K-W/ 0,5577
IL-10	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 23,52)	57,62 (0,0 – 113,6)	99,76 (38,93 – 162,7)	K-W/ 0,0041
IL-2	0,0 (0,0 – 0,2800)	0,0 (0,0 – 0,1700)	0,0 (0,0 – 0,9300)	0,0 (0,0 – 0,0)	K-W/ 0,5380
IL-4	1,620 (0,1100 – 1,680)	0,6600 (0,0 – 2,070)	1,850 (1,280 – 2,240)	0,0 (0,0 – 1,000)	K-W/ 0,0953
IL-17A	3,940 (1,950 – 9,040)	3,490 (2,560 – 3,940)	2,280 (0,0 – 4,200)	1,040 (0,0 – 3,630)	A-V/ 0,0514
MCP-1	0,0 (0,0 – 0,0025)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 432,1)	K-W/ 0,7607

Os valores estão expressos como mediana / intervalo interquartil, Valor de p significativo quando <0,05. Ptx, pentoxifilina; Pb, *Plasmodium berghei*; K-W, Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; A-V, ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

Tabela 7 - Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção das citocinas FNT- α , IL-6, INF- γ , IL-12, IL-10, IL-2, IL-4, IL-17A e da quimiocina CCL2 (MCP-1) no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados e ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, concentração expressa em pg/mL.

Grupos Sobrenadante	Controle	Ptx	Pb	Pb + Ptx	Valor de p
BALB/c					
FNT- α	1236 (871,9 – 1697)	261,5 (135,4 – 466,6)	589,6 (202,3 – 1232)	1553 (728,9 – 3017)	K-W/ 0,0029
IL-6	43943 (39057 – 47974)	28673 (16958 – 43088)	37018 (30770 – 43305)	39390 (28097–49469)	A-V/ 0,1624
IL-12	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	K-W/ 0,9990
IL-10	741,1 (544,4 – 900,8)	74,47 (42,47– 178,1)	344,2 (215,0 – 545,1)	257,2 (138,1– 590,5)	K-W/ 0,0010
MCP-1	100,1 (15,23 – 216,9)	80,92 (0,0 – 767,2)	285,3 (27,69 – 1061)	105,8 (0,0 – 405,3)	K-W/ 0,5894
CBA					
FNT- α	733,1 (246,2 – 845,2)	1156 (70,01 – 2564)	932,2 (283,4 – 1250)	2112 (1353 – 3005)	K-W/ 0,0086
IL-6	22860 (17037– 29909)	21535 (6506– 29086)	40785 (31526– 42982)	46838 (43824 – 49801)	A-V/ 0,0001
IL-12	0,0 (0,0 – 32,46)	0,0 (0,0 – 15,97)	0,0 (0,0 – 25,30)	0,0 (0,0 – 24,35)	K-W/ 0,9969
IL-10	120,5 (26,17 – 249,7)	229,5 (0,0 – 508,3)	478,4 (244,8 – 559,5)	326,2 (269,4 – 1036)	K-W/ 0,0946
MCP-1	0,0 (0,0 – 61,22)	0,0 (0,0 – 0,0)	324,2 (51,56 – 413,7)	0,0 (0,0 – 0,0)	K-W/ 0,0008
C57BL/6					
FNT- α	779,1 (537,6 – 969,1)	209,5 (49,97 – 657,2)	798,8 (315,8 – 1467)	1144 (809,3 – 2726)	K-W/ 0,0066
IL-6	35461 (33370– 41782)	16645 (2932– 34194)	35461 (14837– 41953)	28696 (21120– 45023)	A-V/ 0,0276
IL-12	0,0 (0,0 – 9,555)	0,0 (0,0 – 0,0075)	0,0 (0,0 – 0,0100)	0,0 (0,0 – 0,0)	K-W/ 0,8191
IL-10	556,5 (366,8 – 952,0)	112,1 (50,88 – 139,0)	888,2 (143,2 – 1080)	210,1 (149,6 – 991,7)	K-W/ 0,0081
MCP-1	150,9 (14,75 – 475,5)	0,0 (0,0 – 52,50)	0,0 (0,0 – 438,8)	0,0 (0,0 – 57,62)	K-W/ 0,0846

Os valores são expressos como mediana / intervalo interquartil, Valor de p significativo quando <0,05. Ptx, pentoxifilina; Pb, *Plasmodium berghei*; K-W, Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; A-V, ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

Tabela 8 – Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na produção das citocinas FNT- α , IL-6, INF- γ , IL-12, IL-10, IL-2, IL-4, IL-17A e da quimiocina CCL2 (MCP-1) nos homogenatos do tecido cerebral dos animais BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, concentração expressa em pg/mL.

Grupos Homogenatos	Controle	Ptx	Pb	Pb + Ptx	Valor de p
BALB/c					
FNT- α	113,7 (78,41-122,4)	106,7 (92,05-118,9)	100,7 (77,63-118,9)	100,7 (86,07-104,1)	K-W/ 0,8298
IL-6	245,1 (193,6-275,5)	232,6 (222,2-263,7)	183,5 (161,0-202,2)	176,4 (146,8-198,7)	A-V/ 0,0002
INF- γ	22,43 (20,77-28,54)	21,80 (20,77-22,65)	60,70 (24,32-113,2)	27,87 (23,44-65,04)	K-W/ 0,0018
IL-12	35,81 (19,66-51,43)	71,57 (59,69-79,50)	81,56 (51,99-98,33)	69,81 (56,02-96,57)	A-V/ 0,0154
IL-10	0,0 (0,0-16,02)	20,07 (4,453-25,58)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	K-W/ 0,0062
IL-2	3,815 (2,790-4,875)	3,600 (3,480-4,675)	2,270 (1,715-2,905)	2,130 (1,413-3,100)	A-V/ 0,0002
IL-4	0,5500 (0,1100-1,030)	2,610 (1,850-3,060)	1,850 (1,225-2,100)	1,650 (0,9275-2,353)	K-W/ 0,0045
IL-17	1,070 (0,9950-1,255)	1,810 (1,520-2,033)	2,030 (1,370-2,605)	2,015 (1,393-2,633)	K-W/ 0,0216
MCP-1	134,5 (122,2-182,8)	181,4 (148,5-226,9)	216,5 (180,5-293,3)	168,5 (141,9-216,3)	K-W/ 0,0555
CBA					
FNT- α	60,91 (22,75-109,3)	51,63 (37,27-74,18)	54,94 (33,59-135,5)	55,84 (25,84-89,49)	K-W/ 0,7598
IL-6	203,8 (187,1-214,3)	208,9 (163,2-263,1)	242,5 (159,3-298,0)	179,4 (161,0-207,1)	A-V/ 0,3484
INF- γ	15,99 (13,02-19,47)	16,29 (14,83-20,27)	21,92 (18,31-69,65)	154,5 (89,49-215,5)	K-W/ 0,0003
IL-12	52,15 (23,89-62,85)	36,97 (4,378-60,56)	70,98 (40,43-86,31)	44,67 (17,52-71,28)	K-W/ 0,2535
IL-10	0,0 (0,0-18,75)	0,0 (0,0-0,0)	24,00 (21,12-45,39)	0,0 (0,0-0,0)	K-W/ 0,0013
IL-2	2,830 (1,920-3,070)	3,050 (2,055-4,563)	4,665 (3,693-5,813)	2,390 (1,140-3,028)	A-V/ 0,0121
IL-4	1,280 (0,1100-2,070)	0,4150 (0,0-0,9200)	1,900 (0,7200-6,630)	1,365 (0,4725-3,503)	K-W/ 0,0410
IL-17	1,420 (0,9000-2,080)	1,090 (0,2050-1,658)	1,890 (1,450-2,250)	1,110 (0,2050-1,503)	A-V/ 0,2184

MCP-1	174,6 (144,5 – 240,2)	133,5 (98,66 – 167,8)	275,2 (204,8 – 365,8)	282,9 (241,7 – 358,0)	K-W/ 0,0010
C57BL/6					
FNT- α	127,7 (99,36– 151,0)	105,0 (80,98– 121,1)	115,4 (57,51– 181,4)	74,18 (62,43 – 112,4)	A-V/ 0,3945
IL-6	296,2 (246,4 – 307,9)	217,1 (179,9 – 244,3)	180,5 (156,8 – 189,5)	145,3 (138,0 – 165,0)	A-V/ P<0.0001
INF- γ	18,55 (18,20 – 20,46)	19,36 (17,34 – 21,44)	23,97 (20,43 – 37,63)	34,27 (23,27– 42,67)	K-W/ 0,0008
IL-12	41,86 (27,03 – 49,56)	50,43 (36,48 – 61,74)	111,9 (79,29 – 117,5)	78,00 (50,18 – 92,71)	K-W/ 0,0030
IL-10	0,1850 (0,0 – 3,400)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 1,110)	0,0 (0,0 – 0,0)	K-W/ 0,2449
IL-2	4,840 (4,000– 5,693)	3,315 (2,263 – 4,115)	2,435 (1,590– 2,540)	1,235 (0,9275– 1,770)	A-V/ P<0.0001
IL-4	1,480 (1,113– 1,913)	1,365 (1,043– 2,083)	1,475 (0,8050– 1,975)	1,480 (0,7500– 1,858)	A-V/ 0,9921
IL-17A	1,700 (1,060– 2,003)	1,670 (1,155 – 1,935)	3,165 (2,358– 3,433)	2,335 (1,630– 2,758)	A-V/ 0,0031
MCP-1	96,76 (73,49 – 123,6)	102,3 (94,60 – 118,8)	119,2 (104,2 – 198,7)	115,7 (74,48 – 216,1)	K-W/ 0,3554

Os valores são expressos como mediana / intervalo interquartil, Valor de p significativo quando <0,05. Ptx, pentoxifilina; Pb, *Plasmodium berghei*; K-W, Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; A-V, ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.7. RECEPTORES PARA O FNT

Avaliação da expressão dos receptores 1 e 2 para o FNT e receptor para linfotóxina, em micróglia e outras células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

O FNT e a LTX são importantes citocinas envolvidas na gravidade da resposta ao plasmódio. A produção do FNT é estimulada inicialmente por antígenos do parasita que estimulam a resposta do hospedeiro pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, que ativam a via do NF- κ B, e por meio dos fatores de transcrição ativam genes envolvidos na produção das citocinas inflamatórias pela célula alvo. A manutenção da produção dessas citocinas deve ocorrer pela presença mantida do parasito,

mas também pode ser amplificada pela ação da própria citocina em seus três receptores, os receptores 1 e 2 para o FNT e o receptor para a LTX.

Para melhor compreensão dos mecanismos de indução das formas graves da malária, analisamos se havia diferença na expressão dos receptores para o FNT/LTX, na micróglia e nas outras células cerebrais, entre os modelos experimentais da malária, suscetíveis ou resistente à forma cerebral da doença, nos quatro grupos de estudo. As figuras 32, 34 e 35 mostra a expressão dos receptores na micróglia, nos três modelos estudados.

Na figura 32 ABC, verificamos que a expressão do receptor 1 para o FNT na micróglia foi discreta em todos os modelos e em todos os grupos estudados. Quando comparamos a expressão do r1FNT na micróglia, nos três modelos estudados (Figura 34- A, B,C e D), verificamos que no grupo Pb+Ptx houve maior expressão do r1 FNT no modelo CBA do que nos camundongos C57BL/6, cuja expressão desse receptor foi desprezível. Esse mesmo padrão de expressão dos receptores foi observado para o r2FNT no grupo controle (CBA>C57BL6) (Figura 34E).

Na micróglia dos animais controles normais (figura 35A,E,I) verificamos que o receptor para a LTX é o que apresentou maior expressão e o r1FNT, foi o de menor expressão, nos três modelos estudados. No entanto, os camundongos C57BL6 mostraram uma distribuição muito mais ampla do rLTX do que os outros grupos (Fig 35 I).

Após a infecção pelo plasmódio (grupo Pb), os camundongos C57BL6 mostraram uma tendência à maior expressão do r2FNT em relação aos controles normais (32 F), enquanto essa diferença não foi evidenciada para os outros modelos (BALBc e CBA).

As diferenças na expressão dos receptores na micróglia foram mais claramente evidenciadas quando comparamos a expressão dos 3 receptores no mesmo modelo experimental (Figura 35). Observamos que nos animais controles não infectados houve maior expressão do rLTX em todos os modelos (Figura 35 A,E,I); que nos animais CBA, houve maior expressão do r2FNT, que foi semelhante ao do rLTX e maior que a do r1FNT; e que a distribuição da expressão do rLTX foi mais ampla nos camundongos C57BL6.

Quando analisamos os animais infectados pelo plasmódio (grupo Pb), os camundongos C57BL6 mostraram maior expressão do r2FNT e do rLTX, entretanto a maior expressão do r2FNT do que o rLTX foi mais evidente em relação ao grupo controle normal (Figura 35 I,K). Dos animais infectados e tratados com a Ptx, os camundongos CBA mostraram uma menor expressão do r2FNT em relação ao grupo controle (Figura 35 E,H), esse modelo é o que mostrou a melhor resposta de sobrevivência ao tratamento com a Ptx

Em relação aos camundongos CBA observamos que houve tanto maior expressão do rLTX quanto do r2FNT na situação basal (nos animais controle). Nos animais infectados pelo plasmódio, esse mesmo perfil foi mantido, mas com maior expressão do rLTX do que do r2FNT. Os animais infectados e tratados com a Ptx apresentaram menor expressão do r2FNT (Figura 35 E,F,G,H). Enquanto que os animais do grupo C57BL/6, na situação basal, diferentemente do grupo CBA, mostraram maior expressão do rLTX do que do r2FNT e os animais infectados pelo plasmódio mostraram maior expressão dos dois receptores (r2FNT e rLTX), e após o tratamento com a Ptx dos animais infectados, houve menor expressão do rLTX, mas permaneceu elevada a expressão do r2FNT (Figura 35 I,J,K,L).

Analisamos também se havia diferença na expressão dos receptores para o FNT/LTX entre os modelos experimentais da malária, suscetíveis ou resistente à forma cerebral da doença, nos quatro grupos de estudo nas outras células cerebrais. As figuras 36, 37 e 38 mostram a expressão dos receptores nos três modelos estudados.

Na figura 36 ABC, verificamos que a expressão do receptor 1 para o FNT nas outras células cerebrais foi discreta em todos os modelos e em todos os grupos estudados, assim como na micróglia.

Observamos nas outras células do tecido cerebral que no grupo controle normal, o rLTX foi o de maior expressão e o r1FNT foi o de menor expressão no modelo CBA (Figura 37A), enquanto que no modelo C57BL/6, nas outras células do tecido cerebral, observamos que a expressão do rLTX foi maior no modelo C57BL/6 do que em relação ao modelo CBA, e não houve diferença entre o BALB/c e C57BL/6 (Figura 37I).

Após a infecção pelo plasmódio (Pb) observamos nas outras células do tecido cerebral, que houve menor expressão do rLTX apenas no modelo BALB/c (Figura 36G).

Quando comparamos a expressão dos três receptores no mesmo modelo, observamos que nas outras células do tecido cerebral o r1FNT teve menor expressão em todos os grupos dos três modelos (Figura 38). Na situação basal, no grupo controle normal, observamos que no modelo BALB/c, o rLTX mostrou maior expressão que r1FNT (Figura 38-A); Para os modelos CBA e C57BL/6, o receptor de maior expressão foi o r2FNT (Figura 38-E,I).

Exceto para o grupo controle normal do modelo BALB/c, o r2FNT foi o de maior expressão em todos os grupos e modelos.

Após o tratamento dos animais infectados com a PTX (Pb+Ptx), somente o modelo BALB/c mostrou menor expressão do rLTX do que o r2FNT (Figura 38-D). A Figura 33 exemplifica uma leitura dos receptores para o FNT na micróglia.

Em conclusão, o receptor de menor expressão foi o r1FNT, tanto na microglia, como nas outras células cerebrais e o de maior expressão na micróglia foi o rLTX, no entanto nas outras células cerebrais o receptor de maior expressão foi o r2FNT. Na micróglia no grupo controle, para os camundongos BALB/c, houve maior expressão do rLTX, enquanto para o CBA, tanto o r2FNT quanto o rLTX foram mais expressos e no modelo C57BL6, houve predominância do rLTX. Nas outras células cerebrais no grupo controle no BALB/c, que é resistente a forma cerebral da malária, o rLTX mostrou maior expressão e nos modelos susceptíveis CBA e C57BL/6, o r2FNT apresentou maior expressão. Na micróglia nos animais infectados predominou a expressão do rLTX, mas no modelo C57BL6 houve predominância tanto do r2FNT, quanto do rLTX; enquanto que para o grupo Pb+Ptx, houve predomínio do rLTX, mas no modelo CBA, houve quase abolição do r2FNT, enquanto no modelo C57BL6 houve predominância tanto do r2FNT, quanto do rLTX. Nas outras células cerebrais nos animais infectados, o r2FNT mostrou maior expressão em todos os modelos. No grupo dos animais infectados pelo plasmódio e tratados com a Ptx apenas no

modelo CBA o rLTX mostrou maior expressão, enquanto nos modelos BALB/c e C57BL/6 houve menor expressão do rLTX, que também mostraram a maior expressão do r2FNT. No grupo Ptx, o r2FNT também mostrou maior expressão em todos os modelos. Na micróglia no grupo controle dos camundongos C57BL/6 houve predomínio do rLTX, mas no grupo Pb, o r2FNT e o rLTX estavam expressos e após o tratamento dos animais infectados com a Ptx, manteve-se o predomínio da expressão dos r2FNT e do rLTX.

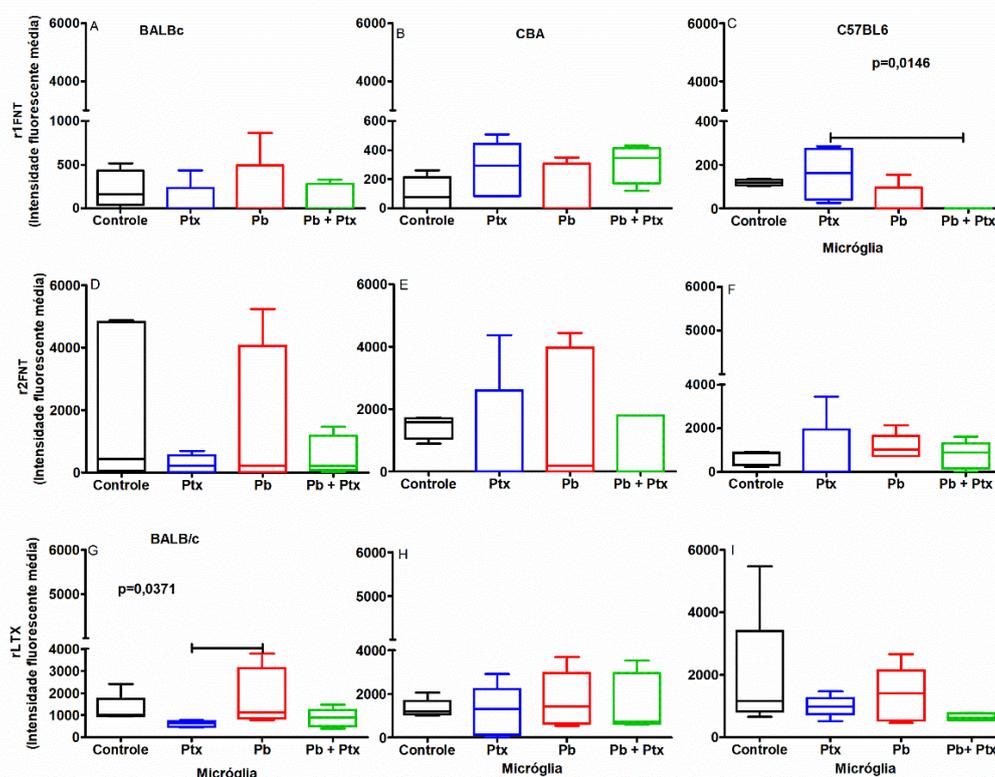


Figura 32- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na expressão dos receptores para o FNT na micróglia de animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). r1FNT: A- BALB/c, $p = 0,7212^1$; B- CBA, $p = 0,0821^1$; C- C57BL/6, $p = 0,0146^1$. r2FNT: D- BALB/c, $p = 0,8450^1$; E- CBA, $p = 0,6458^1$; F- C57BL/6, $p = 0,3144^1$. rLTX: G- BALB/c, $p = 0,0371^1$; H- CBA, $p = 0,8800^2$. I - C57BL/6, $p = 0,2115^1$. As diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

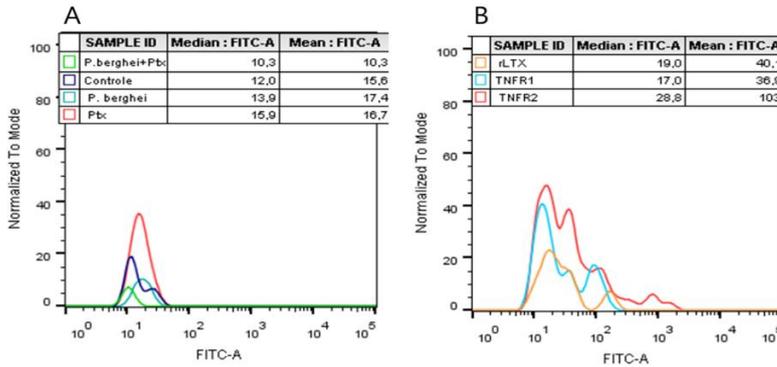


Figura 33- Histograma- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na intensidade de fluorescência média nos receptores para o FNT, na micróglia de animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). A: BALB/c, rLTX, grupos (controle, Ptx, Pb, Pb + Ptx); B: CBA grupo controle(1rFNT, 2rFNT, rLTX).

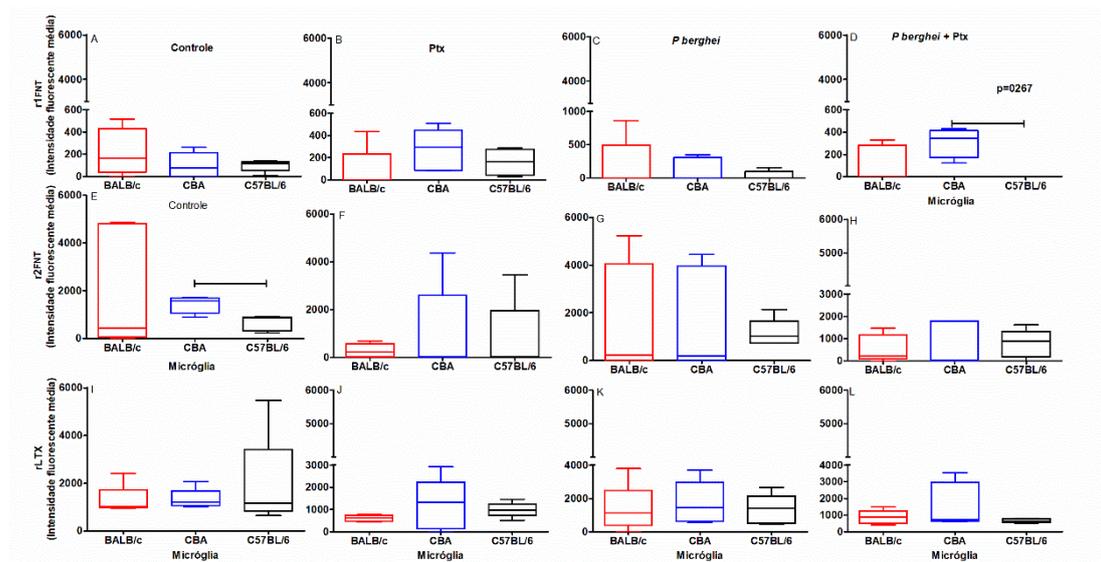


Figura 34 - Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na expressão dos receptores para o FNT (r1FNT, r2FNT, rLTX) por grupo, nos três modelos estudados, na micróglia de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). r1FNT: A- Controle, p = 0,5228¹; B- Ptx, p = 0,1223¹; C- Pb, p = 0,9148¹; D- Pb + Ptx, p = 0,0267¹. r2FNT: E- Controle, p = 0,2691¹; F- Ptx, p = 0,9739¹; G-Pb, p = 0,8906²; H- Pb+Ptx, p = 0,8830¹. rLTX: I- Controle, p = 0,5655¹; J- Ptx, p = 0,3590¹; K- Pb, p = 0,8781¹; L- Pb+Ptx, p = 0,4025¹. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

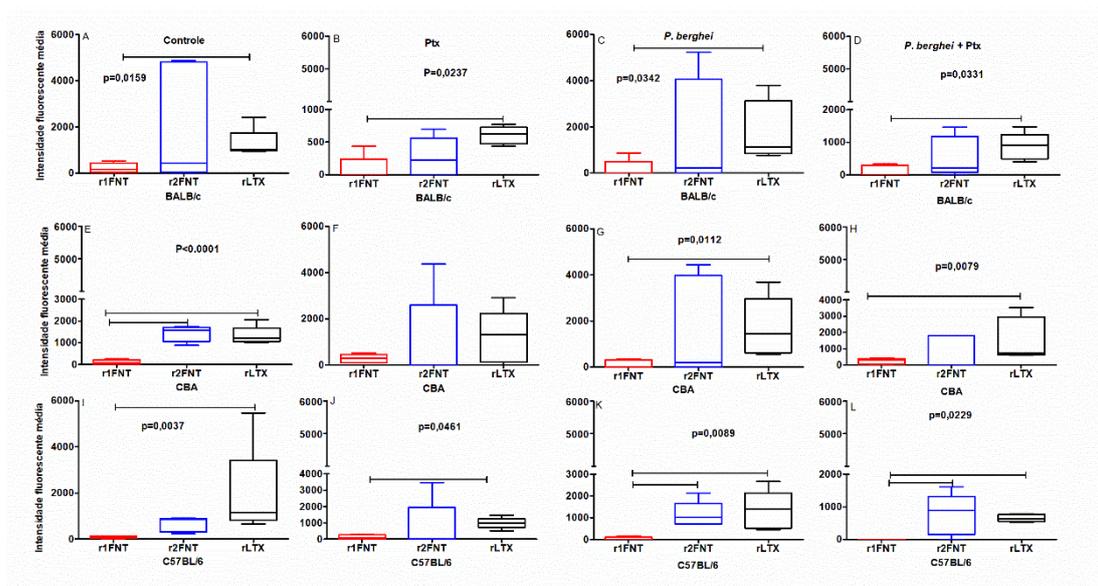


Figura 35 - Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na expressão dos receptores para o FNT(r1 FNT, r2FNT, rLTX) por modelo, nos 3 modelos estudados, na micróglia de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). BALB/c: A- Controle, p = 0,1335¹; B- Ptx, p = 0,0237¹; C- Pb, p = 0,1132¹; D- Pb+ Ptx, p=0,0331¹. CBA: E- Controle, p<0.0001²; F- Ptx, p= 0,5470¹; G- Pb, p = 0,0703¹; H- Pb+ Ptx, p = 0,0610¹. C57BL/6: I- Controle, p = 0,0037¹; J- Ptx, p = 0,0461¹; K- Pb, p = 0,0089¹; L- Pb+ Ptx, p = 0,0229¹. As diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. ¹Kruskal-Wallis, ²ANOVA.

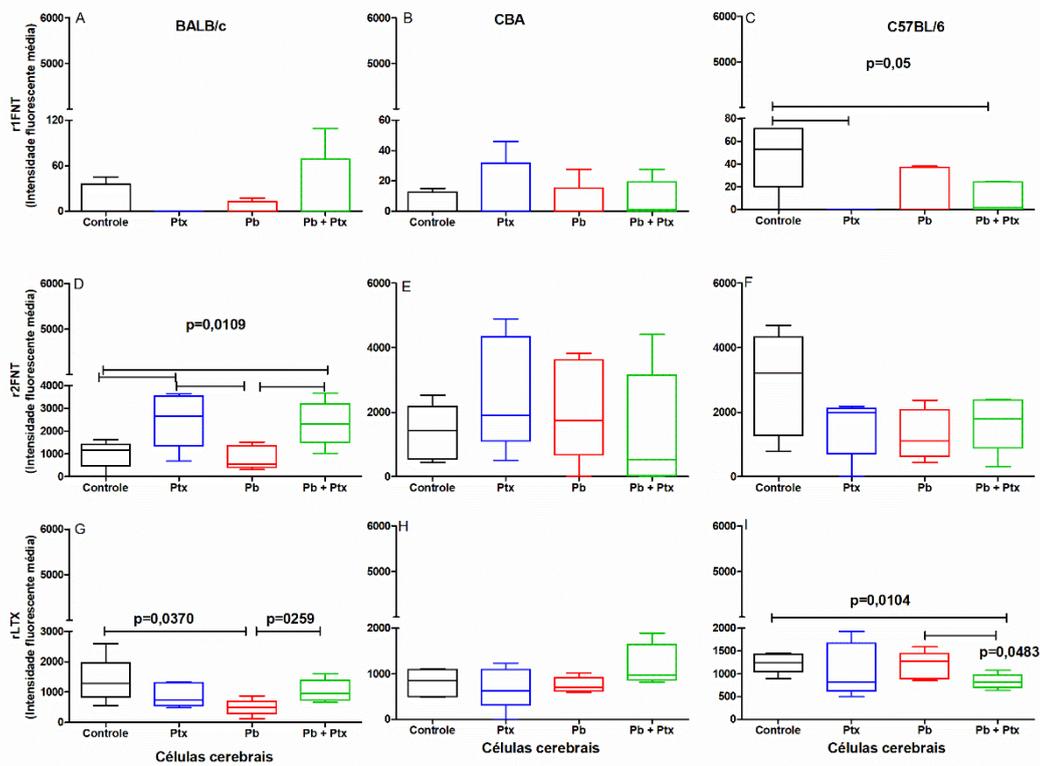


Figura 36 – Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na expressão dos receptores para o FNT nas outras células cerebrais de animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). r1FNT: A- BALB/c, $p = 0,7147^1$; B- CBA, $p = 0,9372^1$; C- C57BL/6, $p = 0,0589^1$. r2FNT: D- BALB/c, $p = 0,0109^2$; E- CBA, $p = 0,5764^2$; F- C57BL/6, $p = 0,1319^2$. rLTX: G- BALB/c, $p = 0,0645^2$; H- CBA, $p = 0,1615^2$. I - C57BL/6, $p = 0,3099^2$. As diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey. rLTX: G- BALB/c, (Controle X Pb), $p = 0,0370$, teste t, (Pb X Pb + Ptx), $p = 0,0259$, teste t; I - C57BL/6, (Pb X Pb + Ptx), $p = 0,0483$, (Controle X Pb + Ptx), $p = 0,0104$, teste t.

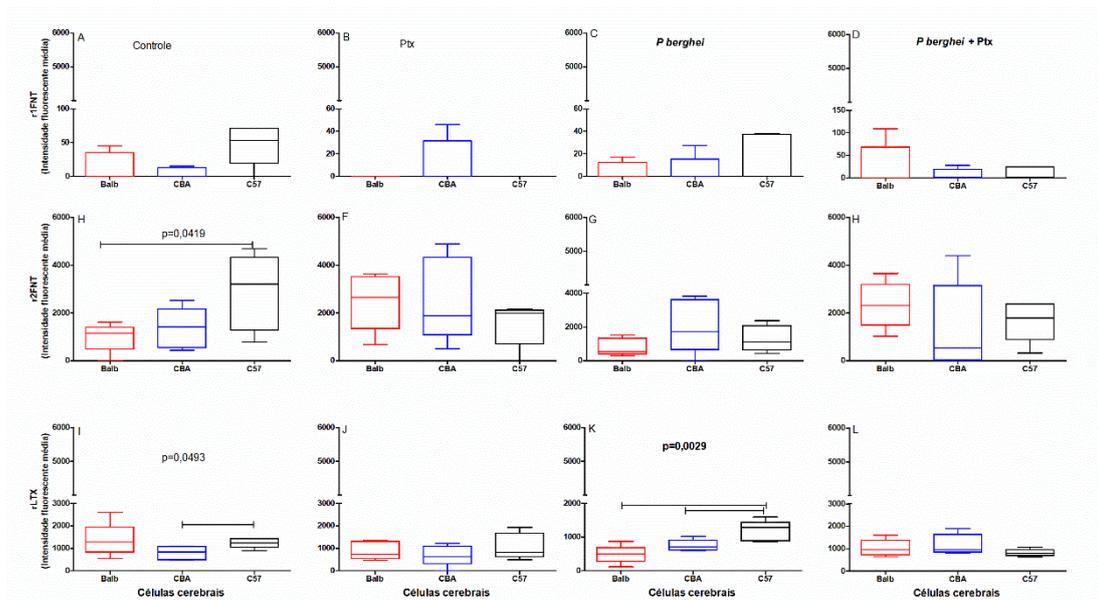


Figura 37 - Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na expressão dos receptores para o FNT (r1FNT, r2FNT, rLTX) por grupo, nos três modelos estudados, nas outras células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). r1FNT: A- Controle, $p=0,08351$; B- Ptx, $p=0,54491$; C- Pb, $p=0,85841$; D- Pb + Ptx, $p=0,98901$. r2FNT: E- Controle, $p=0,04192$; F- Ptx, $p=0,42212$; G-Pb, $p=0,20442$; H- Pb+Ptx, $p=0,50972$. rLTX: I- Controle, $p=0,04931$; J- Ptx, $p=0,46742$; K- Pb, $p=0,00292$; L- Pb+Ptx, $p=0,29072$. As diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

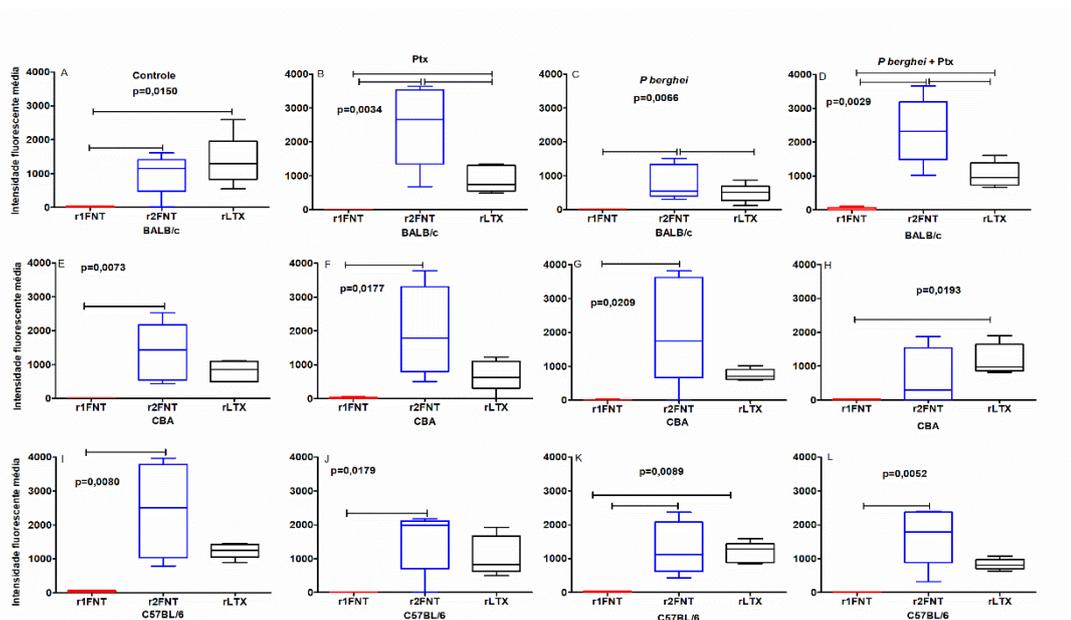


Figura 38 - Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na expressão dos receptores para o FNT (r1 FNT, r2 FNT, rLTX) por modelo, nos 3 modelos estudados, nas células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). BALB/c: A- Controle, p = 0,0150; B- Ptx, p = 0,0034; C- Pb, p = 0,0066; D- Pb+ Ptx, p=0,0029. CBA: E- Controle, p= 0,0073; F- Ptx, p= 0,0177; G- Pb, p = 0,0209; H- Pb+ Ptx, p = 0,0193. C57BL/6: I- Controle, p = 0,0080; J- Ptx, p = 0,0179; K- Pb, p = 0,0089; L- Pb+ Ptx, p = 0,0052. As diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

5.8. MOLÉCULAS DA VIA DO NF- κ B

Avaliação da expressão das moléculas da via do NF- κ B, em micróglias e células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

Após estímulo dos receptores de ativação da via do NF- κ B particularmente pelos receptores para o FNT, o estímulo é transferido para as moléculas adaptadoras TRAF ou FADD, para determinar a escolha de qual via será ativada. Para verificar se há diferença entre os 3 modelos estudados na expressão dessas moléculas adaptadoras, foram analisados por citometria de fluxo a expressão do FADD e do TRAF na micróglio e nas outras células do SNC, nos quatro grupos de estudo.

5.8.1. FADD

Avaliação da expressão da molécula FADD, em micróglia e células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

O FADD é a molécula adaptadora que contém o domínio de morte.

A figura 39 está mostrando a comparação da expressão do FADD entre os 4 grupos estudados, nos três modelos (BALB/c, CBA, C57BL/6). E na figura 40 estão sendo comparados a respostas dos três modelos estudados, segundo os grupos de estudo (controle normal, Ptx, Pb e Pb+Ptx).

Observamos que a intensidade de fluorescência do FADD na micróglia (Figura 39-A,B,C,D) foi mais elevada do que nas outras células do tecido cerebral (39-E,F,G,H), em todos os grupos estudados.

Verificamos também que na micróglia e nas outras células do SNC, no estado basal (grupo controle), houve maior expressão da molécula FADD nos camundongos BALB/c e menor expressão nos animais C57BL/6, Figura 39-A, E.

Após a infecção pelo plasmódio (grupo Pb) não houve diferença em todos os modelos em relação ao grupo controle na intensidade de fluorescência (Figura 40 -A,B,C), porém, nas outras células do tecido cerebral, observamos uma menor expressão do FADD nos camundongos CBA quando infectado pelo parasito (Figura 39- E). Observamos também que a intensidade de fluorescência do FADD no grupo C57BL6 foi maior do que a do grupo CBA quando avaliamos o grupo Pb nas outras células do tecido cerebral (Figura 40-G).

O tratamento dos animais infectados com a Ptx (Pb+Ptx) ocasionou na micróglia dos animais CBA uma expressão do FADD muito maior do que a do grupo não tratado (Pb) (Pb versus Pb+Ptx) (Figura 39 -B). E no modelo C57BL/6, nas outras células cerebrais, o grupo Pb+Ptx mostrou maior expressão da molécula que o grupo controle (Figura 40 -F).

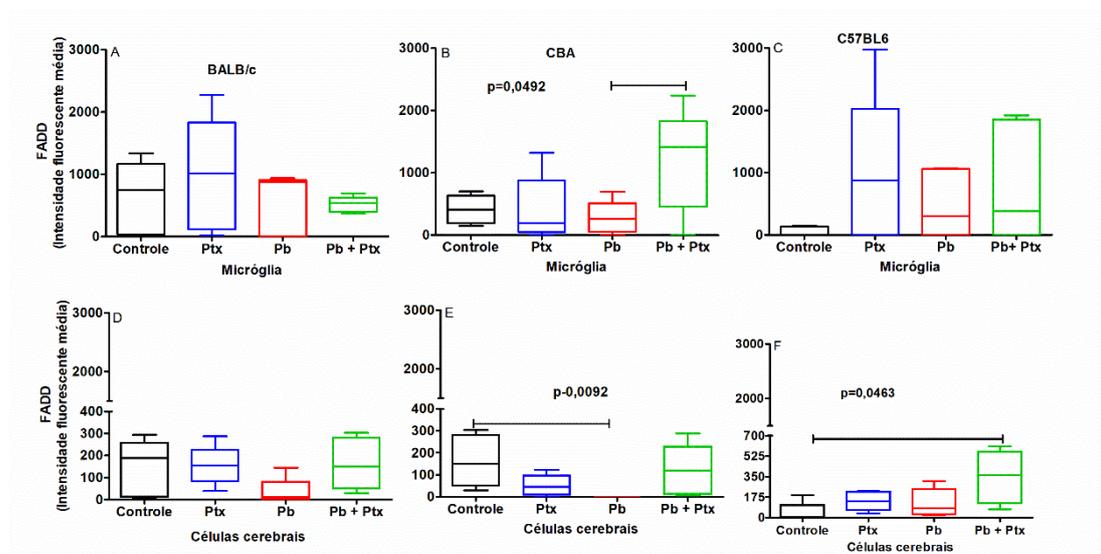


Figura 39- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula FADD na micrógliã e em células cerebrais de animais infectados e não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micrógliã: BALB/c, p=0,6570¹; CBA, p=0,0492²; C57BL/6, p=0,4719¹. Células do SNC: BALB/c, p= 0,0961¹; CBA, p= 0,0092¹; C57BL/6, p=0,0463¹. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

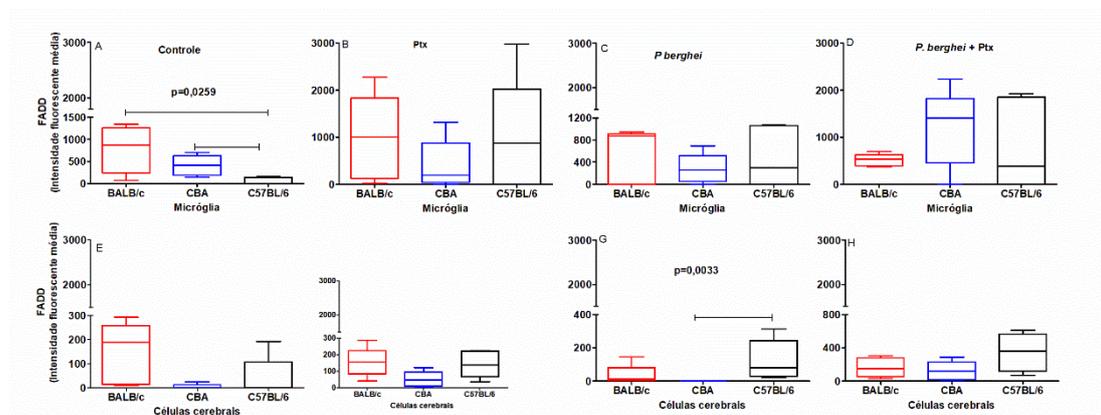


Figura 40 - Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula FADD nos três modelos estudados, na micrógliã e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micrógliã: Controle: p = 0,0259¹; Ptx: p = 0,5451²; Pb: p = 0,8212¹; Pb + Ptx: p = 0,4651¹. Células do SNC: Controle, p= 0,0700¹; Ptx: p = 0,0945²; Pb: p = 0,0033¹; Pb + Ptx: p = 0,1040². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.8.2. TRAF

Avaliação da expressão da molécula TRAF, em micróglia e células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

O TRAF é outra molécula adaptadora que passa o estímulo para o interior da célula para ativação da via do NF κ B.

A figura 41 está mostrando a comparação da expressão do TRAF entre os 4 grupos estudados, nos três modelos (BALB/c, CBA, C57BL/6). E na figura 42 estão sendo comparados a respostas dos três modelos estudados, segundo os grupos de estudo (controle normal, Ptx, Pb e Pb+Ptx).

Observamos que a intensidade de fluorescência do TRAF na micróglia (Figura 41-A,B,C,D), como observamos para o FADD, também foi mais elevada do que nas outras células do tecido cerebral (41 -E,F,G,H), em todos os grupos estudados.

Na outras células do tecido cerebral, observamos que no grupo controle normal houve menor expressão do TRAF pelos camundongos CBA (Figura 42 E).

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do TRAF entre o grupo Pb e o grupo controle normal para nenhum dos modelos estudados, nem na micróglia, nem nas outras células do tecido cerebral quando comparamos a resposta à infecção em cada modelo de estudo (Figura 41). Entretanto, observamos que nas outras células do tecido cerebral, no grupo infectado pelo Pb, houve maior expressão do TRAF pelos camundongos C57BL6 e menor pelos camundongos BALB/c (Figura 42 G).

No grupo infectado e tratado com a Ptx (Pb+Ptx), a micróglia dos camundongos C57BL/6 mostraram maior expressão do TRAF do que o grupo infectado e não tratado (Pb) (Figura 41 C). Nas outras células do tecido cerebral, esse aumento da expressão do TRAF no grupo Pb+Ptx foi evidenciada no modelo CBA (Figura 41 E). Pela comparação entre os modelos, na micróglia, verificamos que o modelo C57BL6 mostrou a maior expressão do TRAF e o BALB/c a menor (figura 42-C).

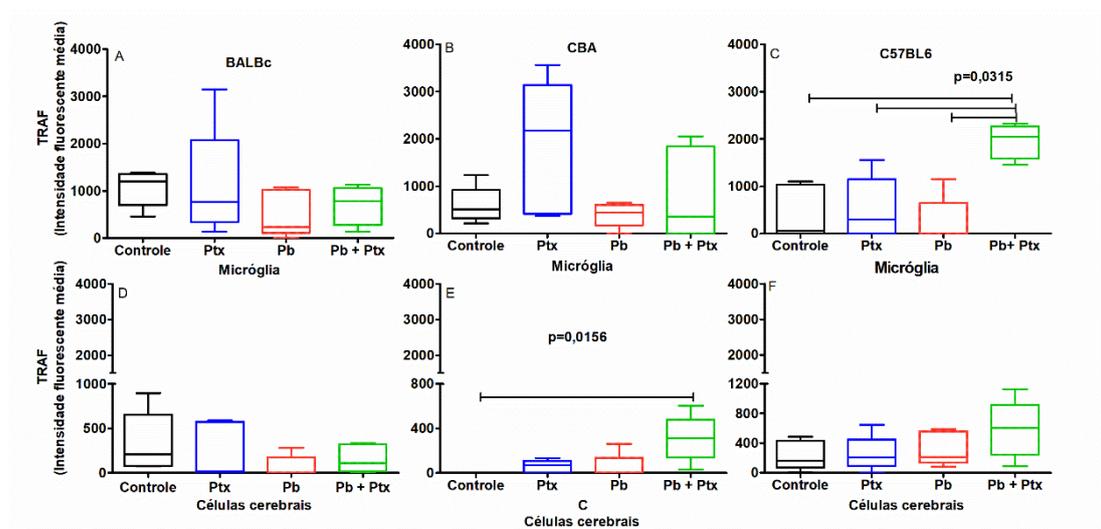


Figura 41 - Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula TRAF na micróglia e em células cerebrais de animais infectados e não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: BALB/c, p= 0,4878²; CBA, p= 0,2826¹; C57BL/6, p= 0,0315¹. Células do SNC: BALB/c, p= 0,2179¹; CBA, p= 0,0156¹; C57BL/6, p= 0,1947². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

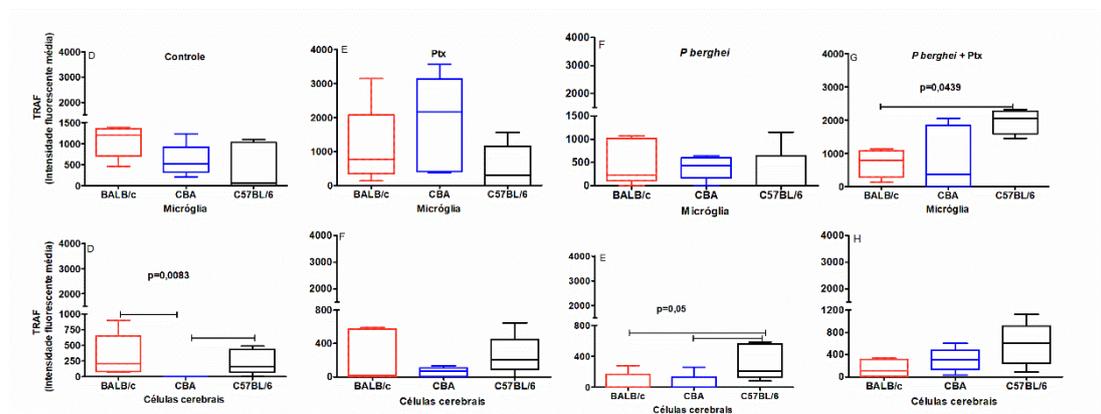


Figura 42- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula TRAF nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n= 5 por grupo (repetido 2 vezes) Micróglia: Controle: p = 0,1046²; Ptx: p = 0,2115²; Pb: p = 0,4651¹; Pb + Ptx: p = 0,0439². Células do SNC: Controle, p= 0,0083¹; Ptx: p = 0,3077¹; Pb: p = 0,0551¹; Pb + Ptx: p = 0,0731². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

Quando analisamos comparativamente a expressão do FADD e do TRAF nos 4 grupos dos 3 modelos, na micróglia, ficou mais evidente que

houve mais expressão do TRAF do que do FADD no grupo infectado pelo plasmódio (Pb) do modelo CBA (Figura 43 G). Nas outras células do tecido cerebral, verificamos que na situação basal (grupo controle normal), os camundongos CBA mostraram maior expressão do FADD do que do TRAF (Figura 44 E).

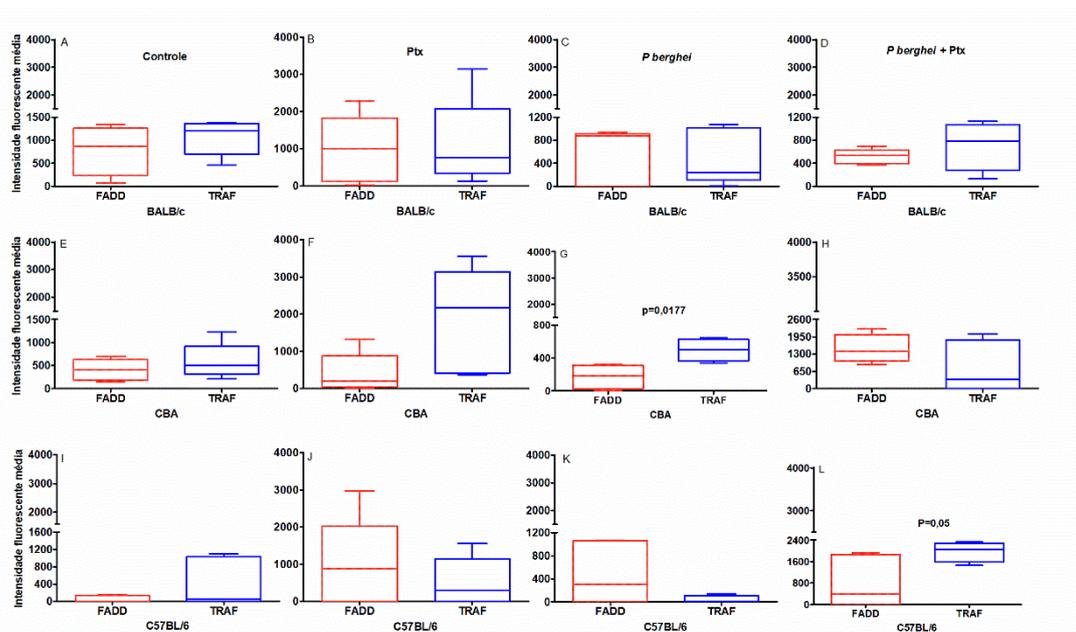


Figura 43- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula FADD e TRAF nos três modelos estudados, na micróglia de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). BALB/c: Controle: p = 0,3964¹; Ptx: p = 0,8427¹; Pb: p = 0,5296²; Pb + Ptx: p = 0,2857². CBA: Controle: p = 0,3794¹; Ptx: p = 0,0633¹; Pb: p = 0,0177¹; Pb + Ptx: p = 0,2473¹. C57BL/6: Controle: p = 0,5038²; Ptx: p = 0,4728¹; Pb: p = 0,3706²; Pb + Ptx: p = 0,0595¹. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

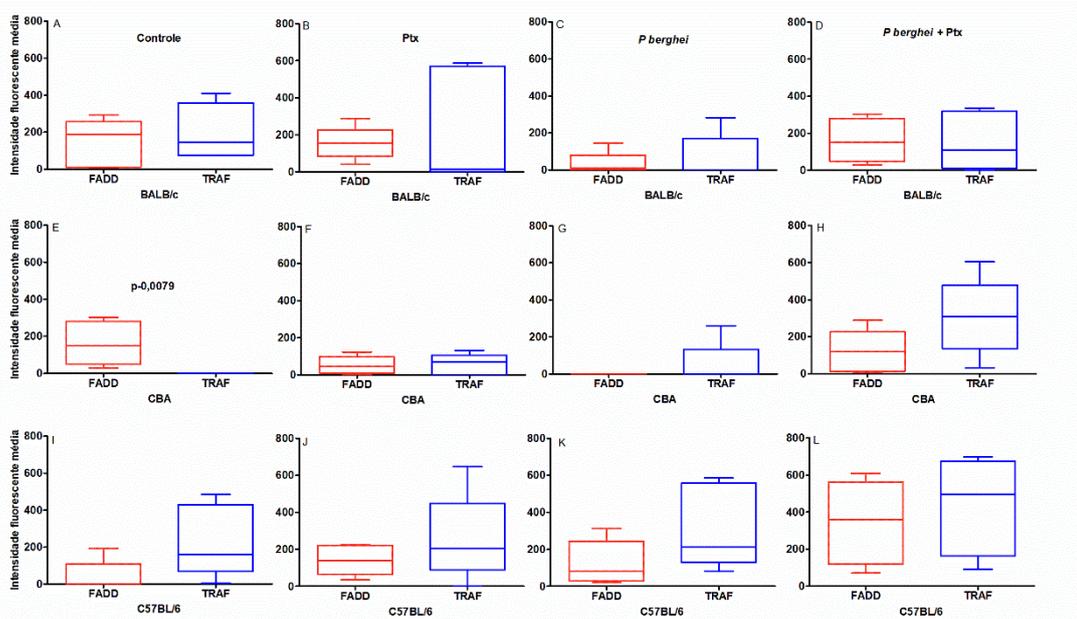


Figura 44- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média das moléculas FADD e TRAF nos três modelos estudados, nas outras células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). BALB/c: Controle: p = 0,6295¹; Ptx: p = 0,6905²; Pb: p = 0,5296²; Pb + Ptx: p = 0,9292¹. CBA: Controle: p = 0,3794¹; Ptx: p = 0,0633¹; Pb: p = 0,0177¹; Pb + Ptx: p = 0,2473¹. C57BL/6: Controle: p = 0,0079²; Ptx: p = 0,8746¹; Pb: p = 0,4407²; Pb + Ptx: p = 0,1144¹. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. ¹Teste t, ²teste de Mann Whitney.

Em conclusão, para o FADD, a expressão foi mais elevada na micróglia do que nas outras células do tecido cerebral. Na situação basal (grupo controle normal), a expressão do FADD foi mais elevada no BALB/C do que C57BL6. Após infecção pelo plasmódio, nas outras células do SNC, no modelo CBA, houve menor expressão do FADD no grupo Pb do que no controle normal. E nas outras células do tecido cerebral no modelo C57BL/6, a expressão do FADD foi maior do que no CBA. No grupo Pb+Ptx, na micróglia, no modelo CBA, Pb+Ptx > Pb. E nas outras células do tecido cerebral, Pb+Ptx > C.

Para o TRAF, a expressão foi mais elevada na micróglia do que nas outras células do tecido cerebral. Nos animais controle normal, nas outras células do tecido cerebral, o modelo C57BL6 teve maior expressão do TRAF do que os outros dois modelos. Após a infecção pelo plasmódio, nas outras células do SNC, o modelo C57BL/6 teve maior expressão do TRAF do que o CBA, e do que o BALB/c. No grupo Pb+Ptx, na micróglia, no modelo

C57BL/6, houve maior expressão do TRAF na micróglia do grupo infectado e tratado, do que no infectado e não tratado. E nas outras células do SNC, Pb+Ptx > C. E na micróglia do grupo Pb+Ptx, observamos que C57BL/6 > BALB/c.

Na comparação entre FADD e TRAF, na micróglia do modelo CBA, no grupo Pb, observamos TRAF > FADD. E na micróglia do modelo C57BL/6, no grupo Pb+Ptx, observamos TRAF > FADD. Nas outras células do tecido cerebral, no modelo CBA, houve predominância absoluta da expressão do FADD.

No modelo BALB/c que não apresenta a forma cerebral da malária houve uma distribuição mais equitativa entre as duas moléculas adaptadoras na micróglia e nas outras células cerebrais, tanto no grupo controle quanto no grupo dos animais infectados e o tratamento com a Ptx não alterou a expressão das moléculas. Entre os dois modelos que desenvolvem a forma cerebral da malária, no grupo controle houve uma leve tendência para uma maior expressão do TRAF na micróglia, e nas outras células cerebrais o CBA teve uma maior expressão da molécula FADD e no C57BL/6 a molécula TRAF foi mais expressa.

5.8.3. NIK

Avaliação da expressão da molécula NIK, em micróglia e células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

Observamos que a expressão do NIK é muito maior pelas outras células do tecido cerebral do que pela micróglia. Na micróglia, os modelos BALB/c e CBA tiveram pouca expressão da molécula NIK em todos os grupos e não houve variação significativa entre os grupos (Figura 45 A,B); O modelo C57BL/6 mostrou maior expressão do NIK apenas no grupo dos animais infectados e tratados com a Ptx em relação ao grupo Pb (Figura 45C). Para as outras células do SNC, embora tenha tido maior expressão da molécula NIK, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 45 D,E,F).

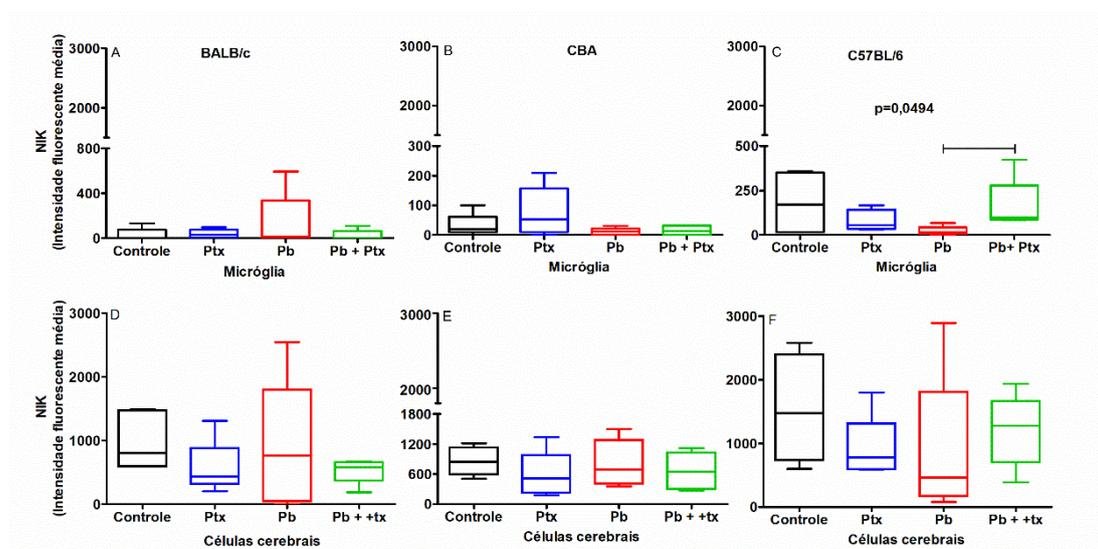


Figura 45- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula NIK na micróglia e em células cerebrais de animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: BALB/c, p= 0,7561¹; CBA, p= 0,2673¹; C57BL/6, p= 0,0494¹ Células do SNC: BALB/c, p= 0,2879¹; CBA, p= 0,6812²; C57BL/6, p= 0,2633¹. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

Quando comparamos a expressão do NIK por grupo de estudo, nos 3 modelos, observamos que o C57BL/6 apresentou maior expressão da molécula nos animais do grupo infectado e tratado com a Ptx, tanto na micróglia como nas outras células do SNC (Figura 46D, H).

Em conclusão, a expressão do NIK na micróglia foi baixa nos três modelos, e apenas no modelo C57BL/6, houve aumento da sua expressão no grupo Pb+Ptx em relação ao grupo Pb. As outras células cerebrais mostraram maior expressão da molécula NIK que na micróglia, mas não houve variação na expressão da molécula entre os grupos nos três modelos. Apenas o modelo C57BL/6 mostrou maior expressão estatisticamente significativa do NIK em relação aos outros modelos estudados, tanto na micróglia quanto nas outras células cerebrais.

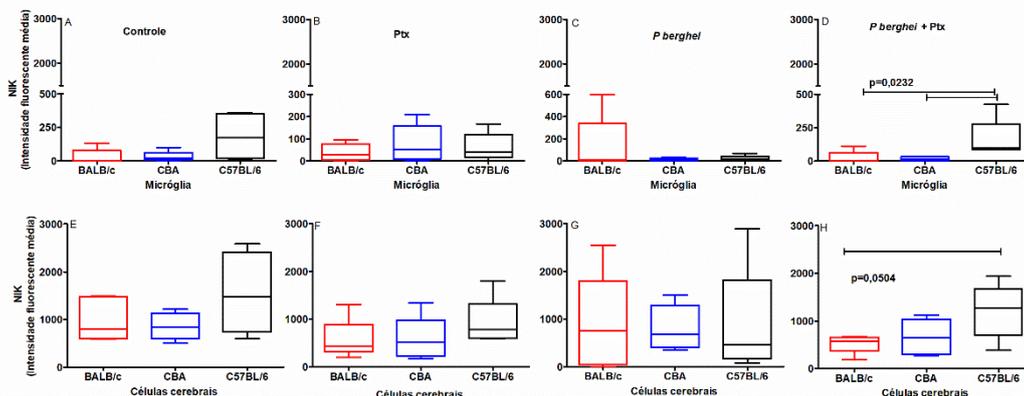


Figura 46 - Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula NIK nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: Controle: p = 0,3448¹; Ptx: p = 0,6405²; Pb: p = 0,6402¹; Pb + Ptx: p = 0,0232¹. Células do SNC: Controle, p = 0,1759²; Ptx: p = 0,1738¹; Pb: p = 0,8781¹; Pb + Ptx: p = 0,0504². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.8.4. JNK

Avaliação da expressão da molécula JNK, em micróglia e células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

Observamos que a expressão do JNK foi muito mais elevada na micróglia do que nas outras células do tecido cerebral (Figura 47), exceto para o modelo C57BL/6, cuja expressão na micróglia foi mínima (Figura 47 C).

Apenas nas outras células do tecido cerebral verificamos que para os camundongos do modelo CBA houve menor expressão do JNK após a infecção pelo plasmódio (Pb) (Figura 47E). Pela comparação entre os grupos dos três modelos, os camundongos C57BL/6 mostraram menor expressão do JNK do que os outros modelos, em todos os grupos de estudo da micróglia (Figura 48 A,B,D).

Em conclusão, observamos maior expressão do JNK na micróglia do que nas outras células do tecido cerebral. Porém, na microglia dos camundongos C57BL/6, a expressão do JNK foi mínima. Apenas nas outras células do tecido cerebral dos camundongos CBA, a infecção pela plasmódio

ocasionou menor expressão do JNK. A expressão do JNK foi muito maior na micróglia dos camundongos BALB/c e CBA, do que no modelo C57CL/6.

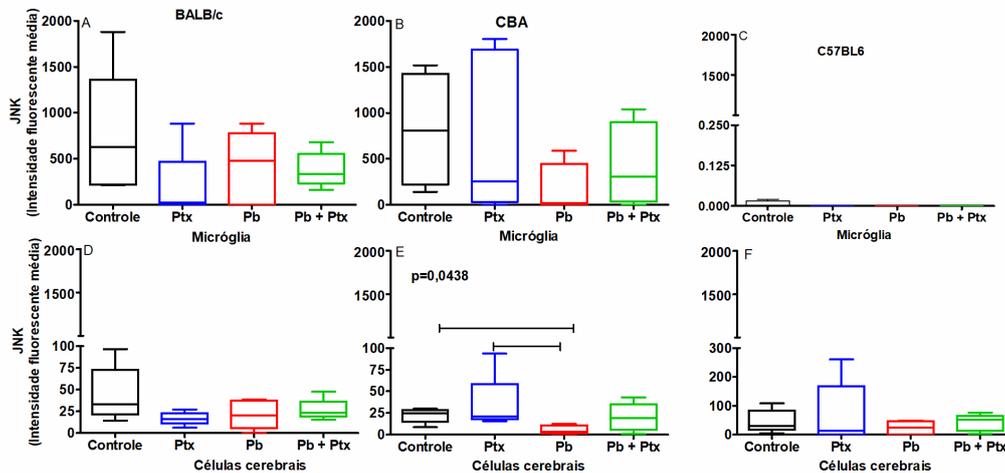


Figura 47- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula JNK na micróglia e em células cerebrais de animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: BALB/c, p = 0,3850¹; CBA, p = 0,3847²; C57BL/6, p = 0,9825¹. Células do SNC: BALB/c, p = 0,2328¹; CBA, p = 0,0438¹; C57BL/6, p = 0,6050¹. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

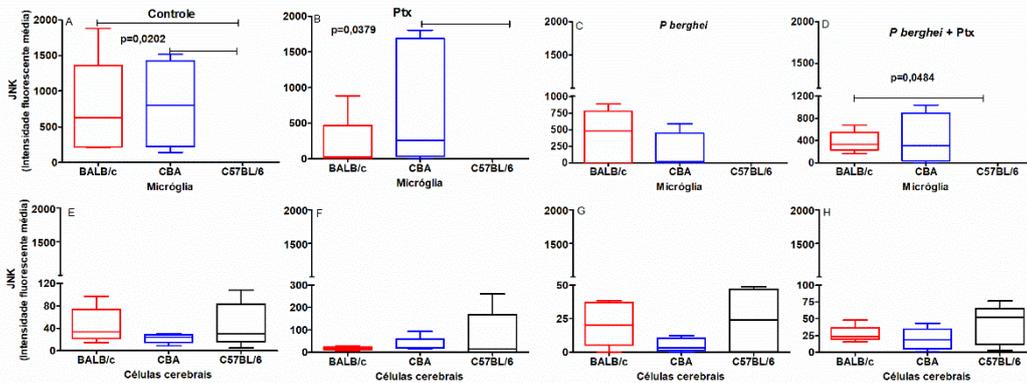


Figura 48- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula JNK nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: Controle: p = 0,0202; Ptx: p = 0,0379; Pb: p = 0,1949; Pb+Ptx, p = 0,0484. Células do SNC: Controle, p = 0,2503; Ptx: p = 0,4724; Pb: p = 0,3645; Pb+Ptx: p = 0,3679. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

Observamos que nas micróglia dos camundongos BALB/c e CBA predominou a expressão das moléculas JNK (Figura 49 A,B,C,D, E,F,G,H), enquanto na micróglia dos camundongos C57BL/6 houve predominância da expressão do NIK (Figura 49 I,J,K,L). Nas outras células cerebrais nos três modelos em todos os grupos a maior expressão foi da molécula NIK (Figura 50).

Em conclusão, os modelos BALB/c e CBA utilizam a via do JNK, demonstrado pela maior expressão da molécula JNK em todos os grupos na e micróglia e nas outras células cerebrais a maior expressão foi da molécula NIK. Enquanto que o modelo C57BL/6 utiliza a via do NIK, demonstrada pela maior expressão dessa molécula em todos os grupos, tanto na micróglia quanto nas outras células cerebrais.

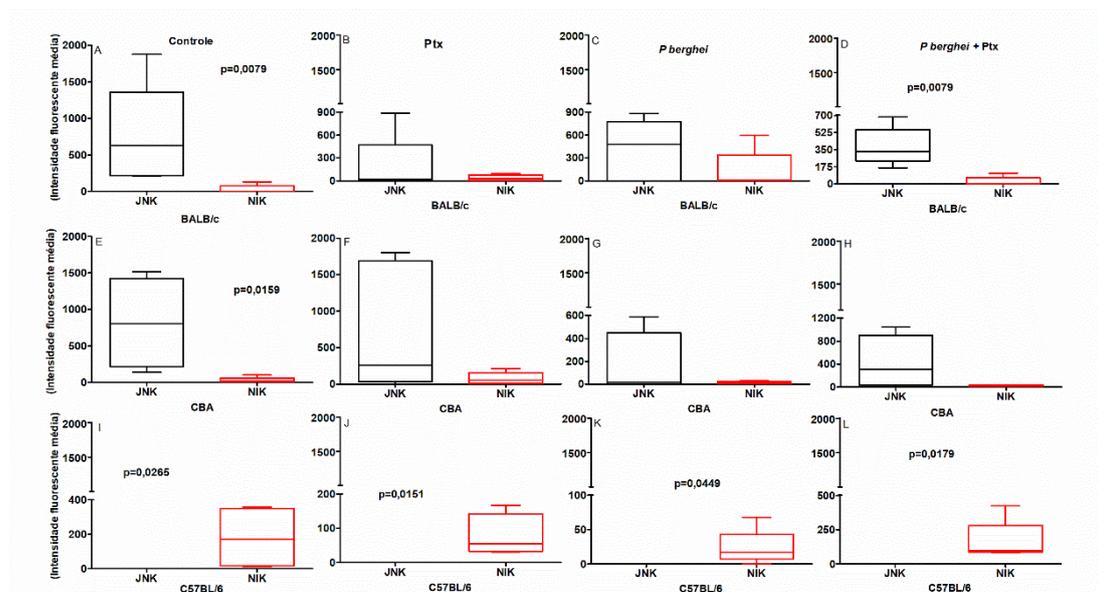


Figura 49- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade da Fluorescência Média das moléculas NIK e do JNK nos três modelos estudados, na micróglia de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). BALB/c: Controle: p = 0,0079; Ptx: p = 0,9166; Pb: p = 0,5179; Pb + Ptx: p = 0,0079. CBA: Controle: p = 0,0159; Ptx: p = 0,2492; Pb: p = 0,5179; Pb+Ptx: p = 0,1706. C57BL/6: Controle: p = 0,0265; Ptx: p = 0,0151; Pb: p = 0,0449; Pb+Ptx: p = 0,0179. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste de Mann Whitney.

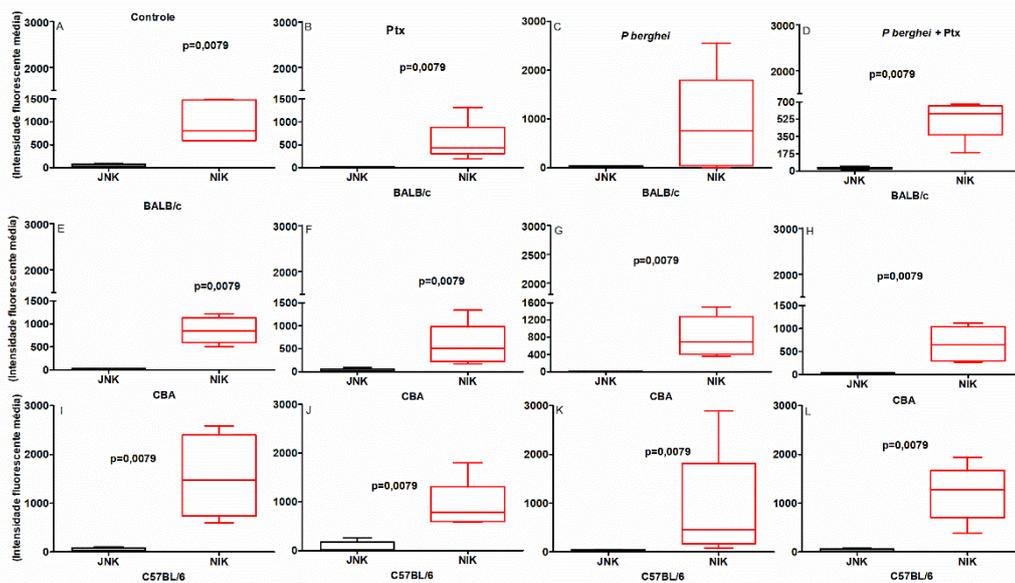


Figura 50- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média das moléculas NIK e do JNK nos três modelos estudados, nas outras células do tecido cerebral de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliada por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). BALB/c: Controle: p = 0,0079; Ptx: p = 0,0079; Pb: p = 0,5179; Pb + Ptx: p = 0,0079. CBA: Controle: p = 0,0079; Ptx: p = 0,0079; Pb: p = 0,0079; Pb+Ptx: p = 0,0079. C57BL/6: Controle: p = 0,0079; Ptx: p = 0,0079; Pb: p = 0,0079; Pb+Ptx: p = 0,0079. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste de Mann Whitney.

5.8.5. I κ B

Avaliação da expressão da molécula I κ B, em micróglia e células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6, infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

A molécula I κ B é central na via do NF κ B, pois é a sua fosforilação que vai liberar as moléculas da via do NF κ B para a transferência para o núcleo e ativação ou repressão de genes alvos.

Houve maior expressão da molécula I κ B pela micróglia do que pelas outras células do tecido cerebral (Figura 51).

Na micróglia, na situação basal (controle) (Figura 52A) e após a infecção pelo plasmódio (Figura 52C), os camundongos C57BL/6 tiveram menor expressão do I κ B do que os camundongos BALB/c e CBA.

Nas outras células do tecido cerebral, no grupo infectado e tratado (Pb+Ptx), os camundongos C57BL/6 apresentaram a maior expressão do I κ B do que os outros dois modelos (Figura 52H).

Em conclusão, o κ B teve maior expressão na micróglia do que nas outras células do tecido cerebral. Na micróglia, o modelo C57BL/6 teve a menor expressão da molécula tanto na situação basal quanto após a infecção pelo plasmódio. E nas outras células do tecido cerebral, o grupo infectado e tratado com a Ptx do modelo C57BL/6 mostrou maior expressão da molécula do que os outros dois modelos.

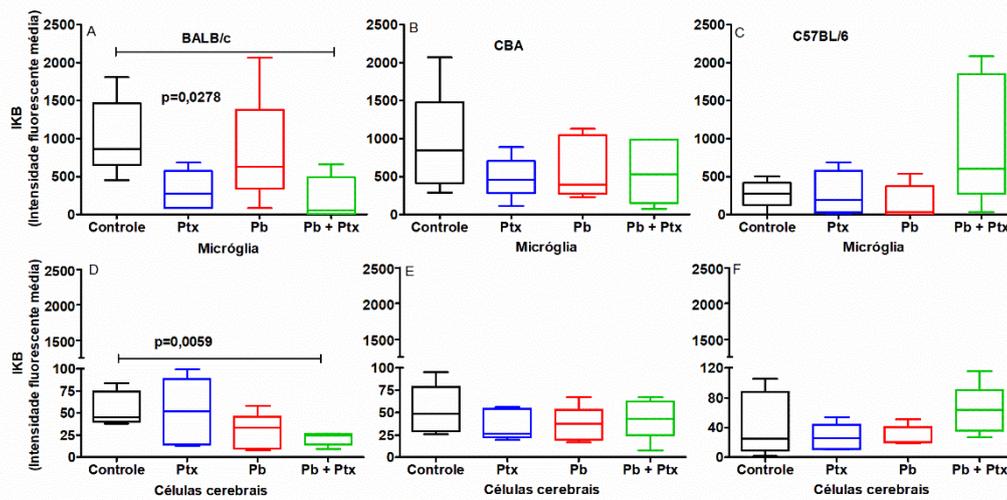


Figura 51- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula κ B na micróglia e em células cerebrais de animais infectados e não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: BALB/c, $p = 0,0278$ ¹; CBA, $p = 0,4894$ ²; C57BL/6, $p = 0,1682$ ¹. Células do SNC: BALB/c, $p = 0,0871$ ¹; CBA, $p = 0,5982$ ²; C57BL/6, $p = 0,2181$ ¹. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

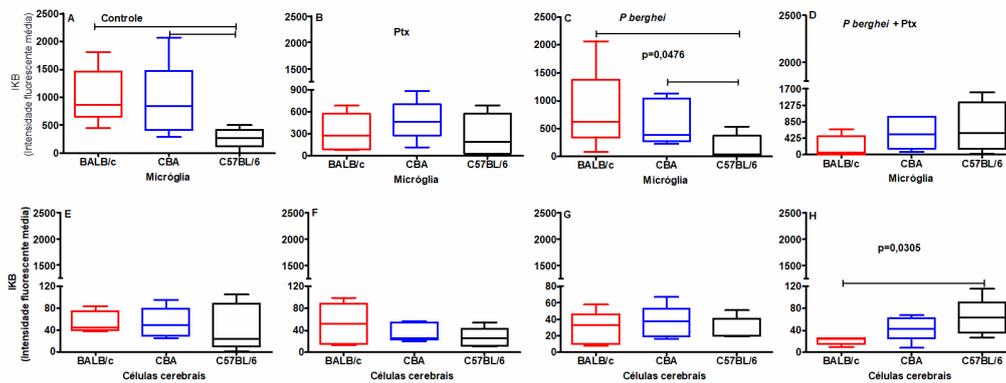


Figura 52- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula $I\kappa B$ nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: Controle: p = 0,0722¹; Ptx; p = 0,4783²; Pb: p = 0,0476¹; Pb+Ptx, p = 0,2990². Células do SNC: Controle, p = 0,8399²; Ptx: p = 0,3530²; Pb: p = 0,7230²; Pb+Ptx: p = 0,0305¹. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

MOLÉCULAS FINAIS DA VIA DO NF κ B

Há 5 membros de fatores de transcrição NF κ B, que ligam-se aos promotores ou amplificadores no ADN, que são Rel A (p65), RelB, c-Rel, p50 e p52 e podem induzir ou suprimir a transcrição de genes. Eles formam dímeros, e mais frequentemente o RelA paria com o p50 e o RelB com o p52. O p50/RelA estimula preferencialmente a via canônica do NF κ B e o p52/RelB estimula preferencialmente a via não canônica do NF κ B. Avaliamos a expressão dessas 5 moléculas na micróglia e nas outras células do tecido cerebral nos 4 grupos de estudo dos três modelos (BALB/c, CBA e C57BL/6).

5.8.6. RelA

Avaliação da expressão da molécula RelA, em micróglia e células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

Houve maior expressão do RelA nas micróglia do que nas outras moléculas do tecido cerebral (Figura 53). Todos os modelos expressaram a molécula Rel A na micróglia (Figura 53 A,B,C,D). Observamos que apenas os

animais do modelo CBA mostrarm menor expressão do RelA quando infectados pelo plasmódio (Pb) em relação ao grupo controle normal (Figura 53 B).

Comparando os grupos entre os modelos observamos que não houve diferença estatística na expressão da molécula RelA entre os modelos em todos os grupos, tanto na micróglia quanto nas outras células cerebrais, (Figura 54).

Em conclusão, apenas o modelo CBA teve menor expressão da molécula RelA após a infecção pelo plasmódio. Não houve diferença estatística para os outros grupos avaliados. Todos os modelos expressaram a molécula RelA.

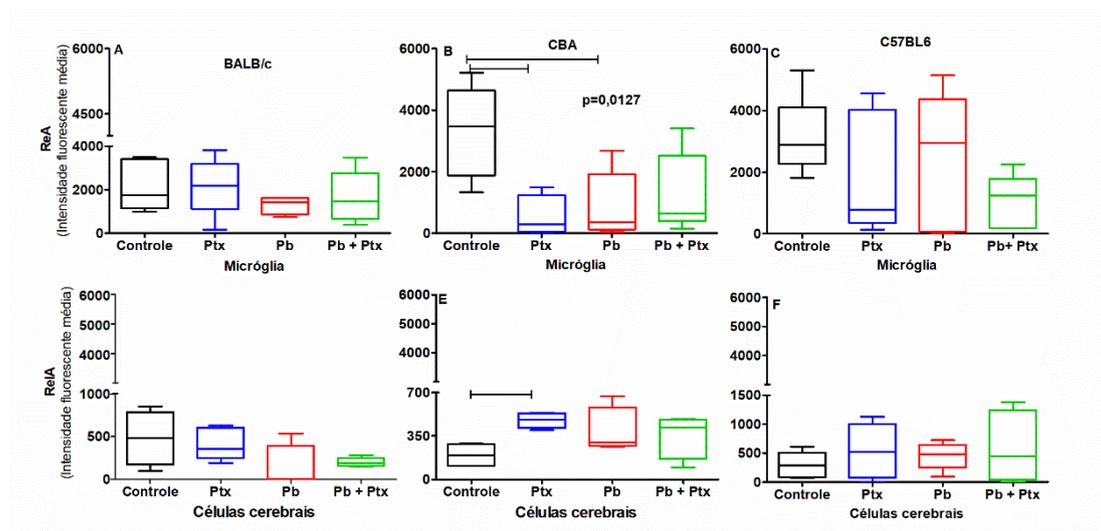


Figura 53- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula RelA na micróglia e em células cerebrais de animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: BALB/c, p = 0,4462¹; CBA, p = 0,0127²; C57BL/6, p = 0,3864¹. Células do SNC: BALB/c, p = 0,0864¹; CBA, p = 0,0929¹; C57BL/6, p = 0,6860². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

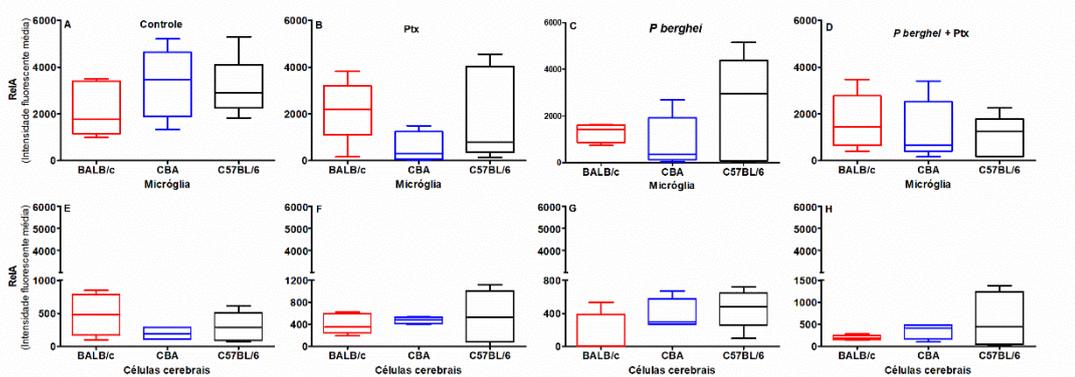


Figura 54- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula RelA nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: Controle: p = 0,3946¹; Ptx: p = 0,2625²; Pb: p = 0,5220¹; Pb+Ptx, p = 0,6870². Células do SNC: Controle, p = 0,2633²; Ptx: p = 0,8031²; Pb: p = 0,1041¹; Pb+Ptx: p = 0,2816². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.8.7. RelB

Avaliação da expressão da molécula RelB, em micróglia e células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

Pela análise dos 4 grupos de estudo para cada modelo, observamos que a expressão do RelB pela micróglia foi insignificante em todos os modelos (55 A,B,C). Embora as outras células do SNC tenham mostrado expressão da RelB, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 55 D,E,F).

Na comparação dos grupos entre os modelos, apenas no grupo Ptx nas outras células cerebrais o CBA mostrou maior expressão da molécula que o C57BL/6 (Figura 56 F), nos demais grupos do estudo não houve variação na expressão da molécula, tanto na micróglia como nas outras células cerebrais (Figura 56 A,B, C,D, E,G,H).

Em conclusão, a expressão da molécula RelB foi irrelevante na micróglia, entretanto, o Rel B mostrou expressão nas outras células cerebrais. A expressão da molécula foi homogênea entre os grupos.

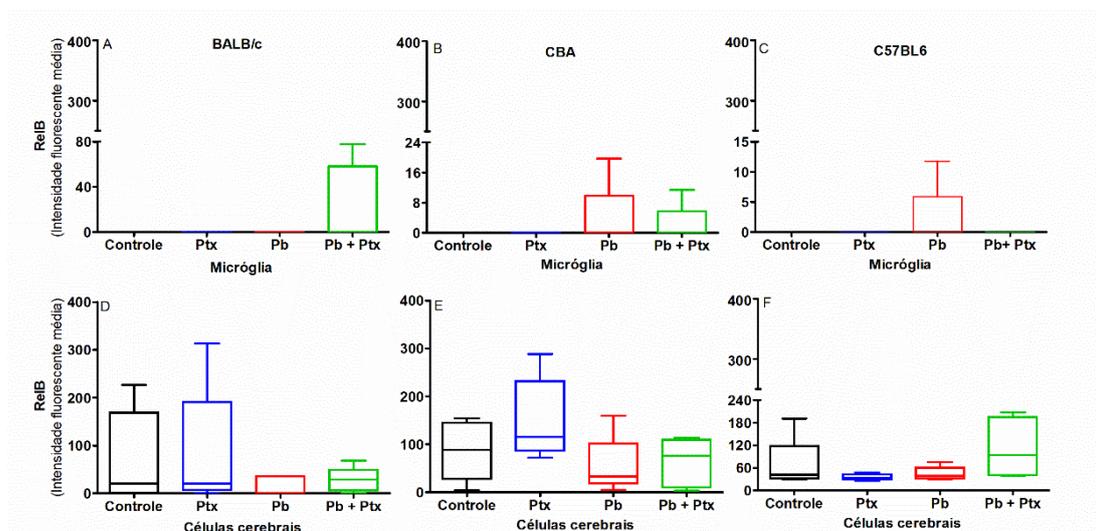


Figura 55- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula RelB na micróglia e em células cerebrais de animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: BALB/c, p = 0,9810; CBA, p = 0,9968; C57BL/6, p = 0,9983. Células do SNC: BALB/c, p = 0,6821; CBA, p = 0,2055; C57BL/6, p = 0,1408. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

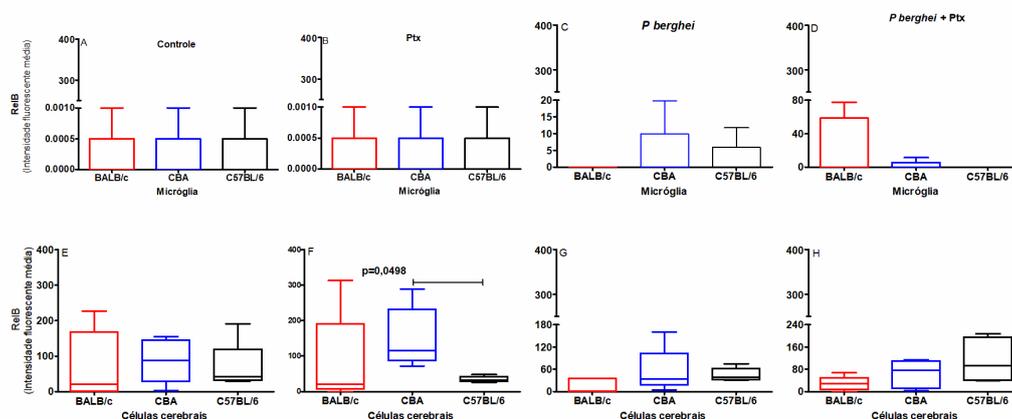


Figura 56 - Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula RelB nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: Controle: p = 1,0000¹; Ptx: p = 1,0000¹; Pb: p = 0,9798¹; Pb+Ptx, p = 0,9204¹. Células do SNC: Controle, p = 0,6126¹; Ptx: p = 0,0498¹; Pb: p = 0,1716¹; Pb+Ptx: p = 0,0927². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.8.8. c-Rel

Avaliação da expressão da molécula c-Rel, em células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 susceptíveis à malária cerebral, infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do c-Rel pelas células do SNC nos grupos estudados, nos 3 modelos (Figura 58 A,B,C). Quando comparamos as respostas pelos três modelos, observamos que no grupo Ptx, o C57BL/6 mostrou maior expressão da molécula que os outros dois modelos (Figura 58B), nos demais grupos, as diferenças não foram estatisticamente significantes (Figura 58 A,C,D).

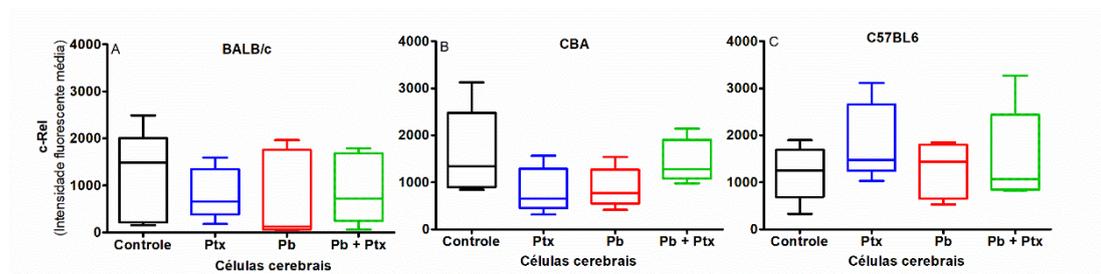


Figura 57- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula c-Rel em células do SNC de animais infectados e não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). BALB/c, p = 0,8206¹; CBA, p = 0,1347²; C57BL/6, p = 0,5529². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

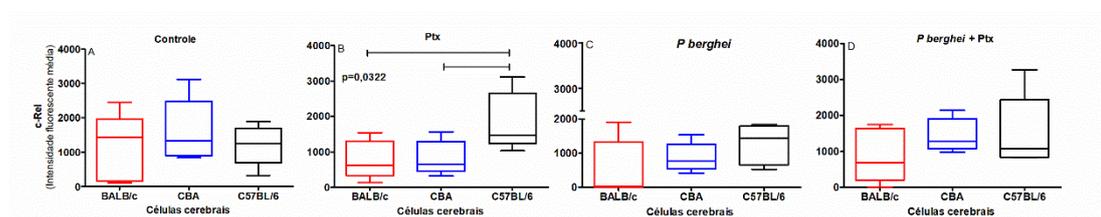


Figura 58- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula c-Rel nos três modelos estudados em células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Controle, p = 0,6352; Ptx: p = 0,0322; Pb: p = 0,2354; Pb+Ptx: p = 0,3763. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.8.9. p50

Avaliação da expressão da molécula p50, em micróglia e células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

Houve maior expressão da molécula p50 na micróglia do que nas outras células do tecido cerebral (Figura 59).

Na situação basal (grupo controle), a expressão do p50 foi mais elevada pelos camundongos C57BL/6 do que pelo CBA, que foi maior do que o BALB/c (C57BL/6 > CBA > BALB/c) (Figura 60A). Entretanto, após a infecção pelo plasmódio (grupo Pb), não houve diferença na expressão do p50 entre os três modelos (Figura 60C). E no grupo infectado e tratado (Pb+Ptx), os camundongos C57BL/6 mostraram menor expressão do p50 do que o grupo CBA (Figura 60D), sendo o oposto do que o observado na situação basal (controle normal), na qual esses animais mostraram a maior expressão do p50 (Figura 60A).

Pela análise das respostas à infecção e ao tratamento em um mesmo modelo, observamos na micróglia, que os camundongos C57BL/6 apresentaram uma menor produção do p50 no grupo infectado em relação ao controle normal (Figura 59 C), e após o tratamento dos animais infectados (Pb+Ptx), o p50 diminuiu ainda mais (Figura 59C).

Em conclusão, os camundongos C57BL/6 apresentaram na micróglia maior expressão da molécula p50 na situação basal, já nos modelos BALB/c e CBA a expressão da molécula p50 foi homogênea nos grupos. Observamos que os camundongos C57BL/6 apresentavam na situação basal maior expressão da molécula p50 que os outros modelos, entretanto no grupo dos animais infectados tratados com a Ptx, o C57BL/6 apresentou menor expressão da molécula p50. Nas outras células cerebrais a expressão da molécula p50 foi irrelevante e não houve diferença entre os grupos de estudo.

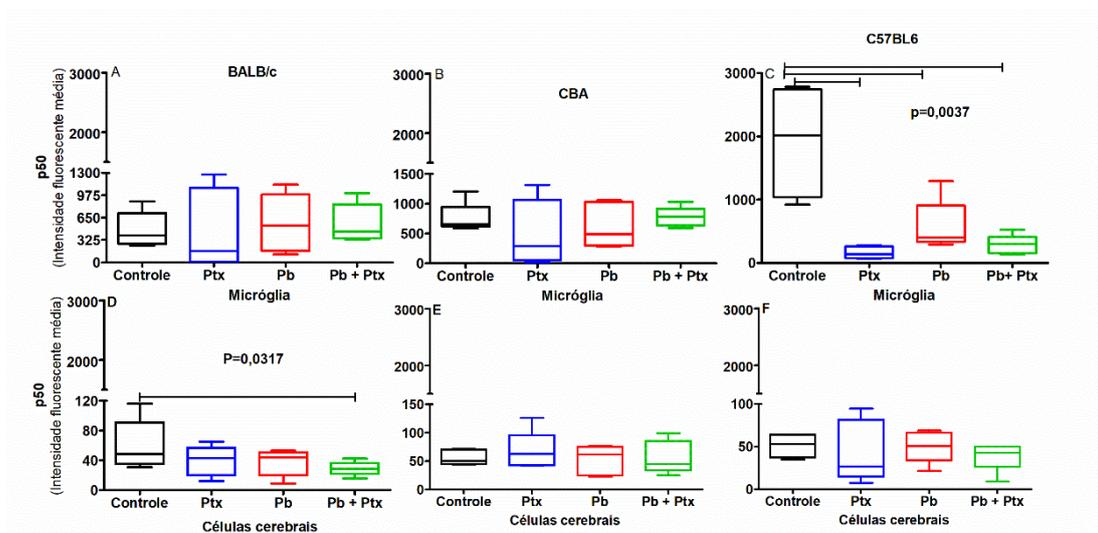


Figura 59- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula p50 em células do SNC de animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micrógli: BALB/c, p = 0,9630²; CBA, p = 0,6843¹; C57BL/6, p = 0,0037¹. Células do SNC: BALB/c, p = 0,1856²; CBA, p = 0,8146²; C57BL/6, p = 0,7082¹. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

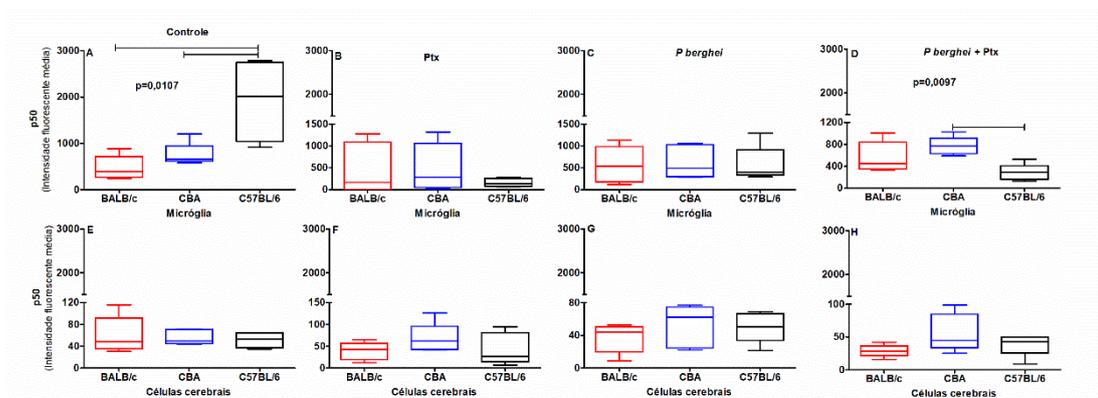


Figura 60- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula p50 nos três modelos estudados, na micrógli e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micrógli: Controle: p = 0,0107¹; Ptx; p = 0,7558¹; Pb: p = 0,9704¹; Pb+Ptx, p = 0,0097². Células do SNC: Controle, p = 0,8165²; Ptx: p = 0,3344²; Pb: p = 0,4902²; Pb+Ptx: p = 0,1738¹. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.8.10. p52

Avaliação da expressão da molécula p52, em micróglia e células cerebrais dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA

Embora as outras células do tecido cerebral também tenham expressado o p52, a expressão dessa molécula foi muito maior na micróglia (Figura 61). Observamos que na micróglia dos camundongos CBA (Figura 61B) e C57BL/6 (Figura 61C) houve menor expressão do p52 no grupo Pb, e que permaneceram baixa após o tratamento com a Ptx (Figura 61B,C).

Quando comparamos a expressão da molécula p52 entre os modelos, verificamos que na micróglia, o grupo BALB/c mostrou maior expressão da p52 do que o grupo C57BL/6 (Figura 62C).

Em conclusão, observamos na micróglia maior expressão do p52 na situação basal tanto nos camundongos CBA quanto C57BL/6, que diminuiu após a infecção e após tratamento com a Ptx. Quando comparamos a expressão da molécula p52 entre os modelos apenas o grupo dos animais infectados com o plasmódio apresentou diferença entre os modelos, sendo que o CBA mostrou maior expressão da p52. Nas outras células cerebrais a expressão da molécula p52 foi homogênea nos grupos.

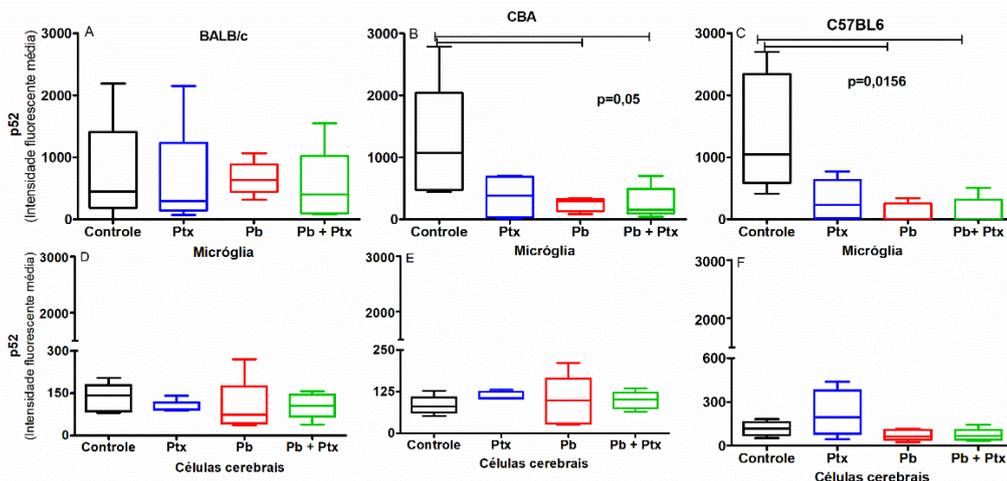


Figura 61- Avaliação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula p52 em células da micróglia e do SNC de animais infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: BALB/c, p = 0,4800; CBA, p = 0,0576; C57BL/6, p = 0,0156. Células do SNC: BALB/c, p = 0,3449; CBA, p = 0,4359; C57BL/6, p = 0,1462. As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

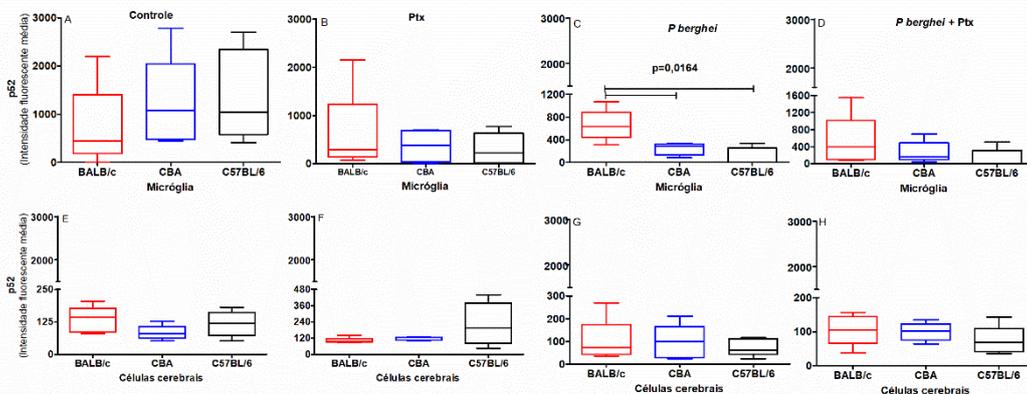


Figura 62- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média da molécula p52 nos três modelos estudados, na micróglia e em células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). Micróglia: Controle: p = 0,3396¹; Ptx: p = 0,9115¹; Pb: p = 0,0164¹; Pb+Ptx, p = 0,3049². Células do SNC: Controle, p = 0,2304²; Ptx: p = 0,1604¹; Pb: p = 0,9324¹; Pb+Ptx: p = 0,4185². As diferenças entre os grupos está mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

5.9. COMPARAÇÃO ENTRE TODAS AS MOLÉCULAS FINAIS DA VIA DO NFκB

Pela análise comparativa da expressão das moléculas finais da via do NFκB, na micróglia observamos que o Rel A (via canônica) foi a molécula mais expressa em todos os grupos e o Rel B (via não canônica) teve uma expressão desprezível na maioria dos grupos e modelos estudados (Figura 63). Entretanto, houve diferença na expressão do RelA entre os modelos. Na micróglia do grupo Pb, os camundongos BALB/c mostraram a menor expressão do RelA e o C57BL/6 a maior (Figura 63C,K). Todos os modelos expressaram o p50 e o p52, mas após a infecção pelo plasmódio, observamos que na micróglia houve menor expressão do p52 do que do p50 (Figura 63 G,K) nos camundongos CBA e C57BL/6. E para o grupo Pb+Ptx, houve menor expressão do p52 do que do p50 no modelo CBA (Figura 63H), o que não ocorreu nos outros dois modelos (Figura 63D,L). Na Figura 64 está uma imagem representativa do histograma das moléculas finais da via do NFκB.

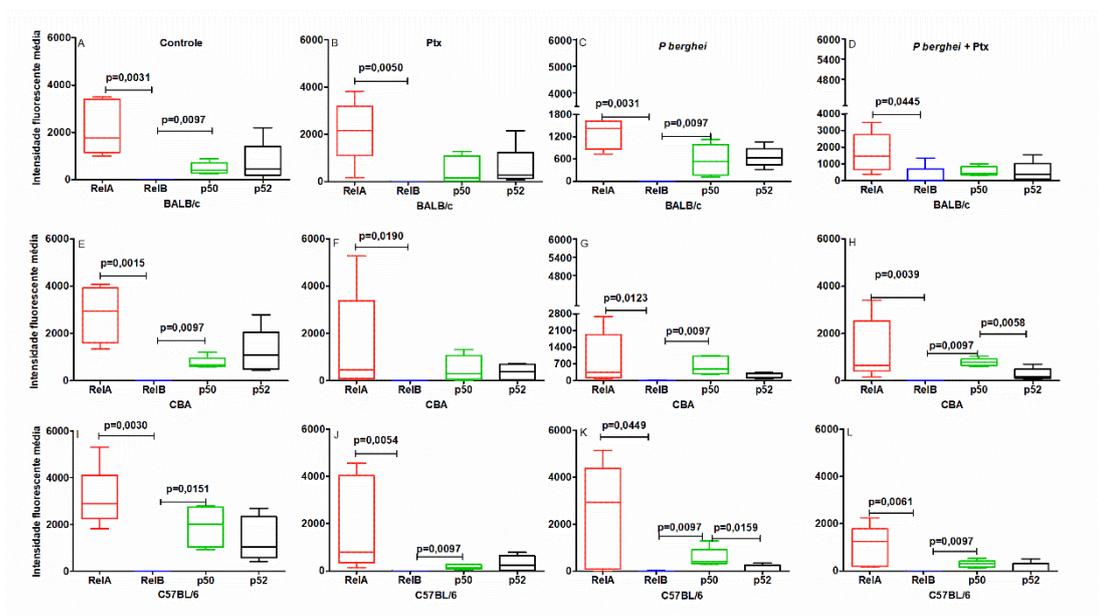


Figura 63- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média de RelA, RelB, P50 e p52 nos três modelos estudados, na micróglia de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). BALB/c Controle, p=0,003; Ptx, p=0,0050; Pb, p=0,0031; Pb+Ptx, p=0,0445; CBA: Controle, p=0,0025; Ptx, p=0,0190; Pb, p=0,0100; Pb+Ptx, p=0,0039; C57BL/6: Controle, p=0,0030; Ptx, p=0,0054; Pb, p=0,0157; Pb+Ptx, p=0,0061; (Kruskal- Wallis, seguido pelo método de Dunn). BALB/c - Controle (RelB X p50), p=0,0097¹; Pb (RelB X p50), p=0,0097¹. CBA – Controle (RelB X p50), p=0,0097¹; Pb+Ptx (p52 X p50), p=0,0058²; Pb+Ptx (RelB X p50), p=0,0097¹. C57BL/6 - Controle (RelA X p52), p=0,0317¹; Ptx (RelB X p50), p=0,0097¹; Pb (RelA X RelB), p=0,0449¹; Pb (RelB X p50), p=0,0097¹; Pb+Ptx (RelB X p50), p=0,0097¹; (¹Mann-Whitney, ²teste t). As diferenças entre os grupos estão mostrada pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

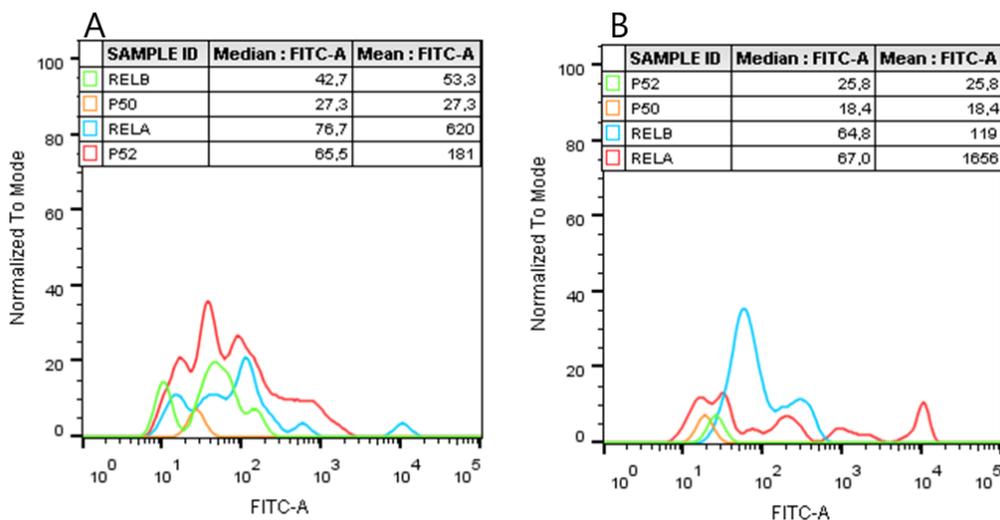


Figura 64- Histograma- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média de RelA, RelB, P50 e p52 nos três modelos estudados, na micróglia de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, avaliado por citometria de fluxo. A: BALB/c grupo Pb (p50,p52,Relb, RelA);B: BALB/c grupo Pb + Ptx (p50,p52,Relb, RelA).

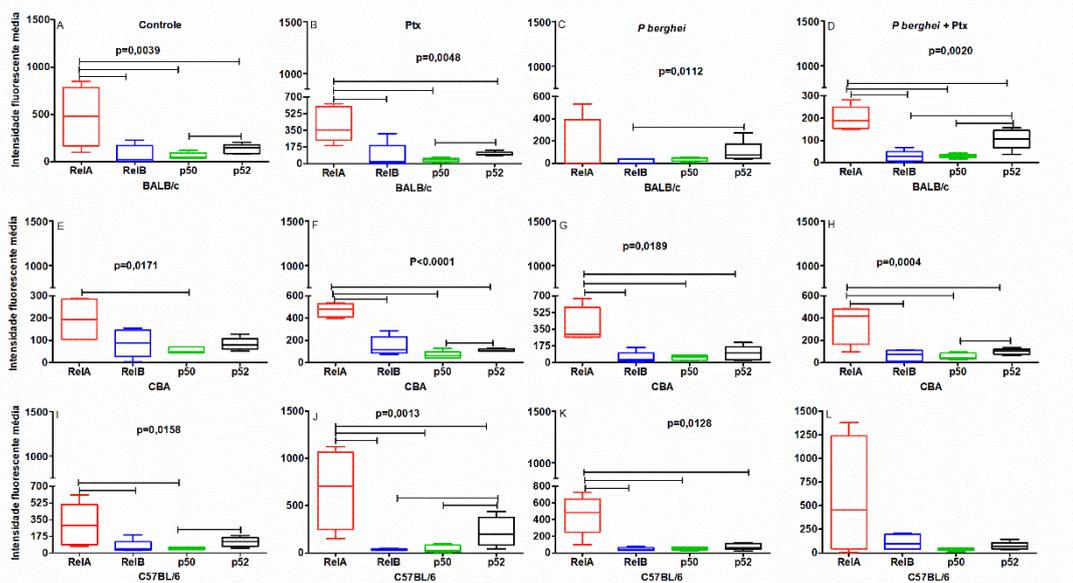


Figura 65- Comparação do efeito do tratamento com a pentoxifilina na Intensidade de Fluorescência Média de RelA, RelB, P50 e p52 nos três modelos estudados, nas outras células cerebrais de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. n = 5 por grupo (repetido 2 vezes). BALB/c - Controle, p = 0,0039²; Ptx, p = 0,0048¹; Pb, p = 0,0800¹; Pb+Ptx, p = 0,0020¹. CBA - Controle, p = 0,0171²; Ptx, p < 0,0001²; Pb, p = 0,0189¹; Pb+Ptx, p = 0,0004². C57BL/6: Controle, p = 0,0158¹; Ptx p = 0,0013²; Pb, p = 0,0128¹; Pb+Ptx, p = 0,2560¹; (¹Kruskal- Wallis, seguido pelo método de Dunn; ²ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls ou Tukey). BALB/c - Controle (p50 X p52), p = 0,0278³; Ptx (RelA X p52), p = 0,0079³, (p50 X p52), p = 0,0079³; Pb (RelB X p52), p = 0,0112³; Pb + Ptx (RelA X p52), p = 0,0178⁴, (RelB X p52), p = 0,0099⁴, (p50 X p52), p = 0,0159³. CBA - Ptx (p50 X p52), p = 0,0254⁴; Pb (RelA X p52), p = 0,0159³; Pb + Ptx (p50 X p52), p = 0,0414⁴. C57BL/6 - Controle (RelA X p50), p = 0,0079³, (p50 X p52), p = 0,0317³; Ptx (RelB X p52), p = 0,0159³, (p50 X p52), p = 0,0317³; Pb (RelA X p52), p = 0,0317³. (³Mann-Whitney, ⁴teste t). As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

Analisando comparativamente a expressão das moléculas finais da via do NFκB, nas outras células cerebrais, observamos predominância da molécula Rel A (via canônica) em todos os grupos, com valores muito mais elevados do que das outras moléculas. O Rel B (via não canônica) teve uma menor expressão entre as moléculas, na maioria dos grupos e modelos estudados (Figura 65). Entretanto, houve diferença na expressão do RelA entre os modelos. No grupo controle, os camundongos BALB/c mostraram a maior expressão do RelA e o CBA a menor (Figura 65 A,E,I). Todos os modelos expressaram as moléculas p50 e p52, todavia a expressão de p52 foi maior que o p50 no grupo controle dos modelos BALB/c e C57BL/6 e no grupo Pb+ Ptx nos modelos BALB/c e CBA.

Em conclusão, nas outras células do tecido cerebral, observamos que molécula RelA foi a de maior expressão em todos os grupos de todos os modelos. O BALB/c quando infectado pelo plasmódio mostrou uma menor expressão do RelA e mostrou uma distribuição mais equilibrada das moléculas p50 e p52 na micróglia. Nas outras células cerebrais, no grupo controle houve maior expressão do RelA e em todos os grupos o p52 mostrou maior expressão que o p50. O camundongo CBA apresentou uma diminuição da expressão do RelA quando infectado pelo plasmódio e diminuiu a expressão do p52, o mesmo ocorrendo com o grupo Pb+ Ptx na micróglia, nas outras células cerebrais tanto a infecção quanto o tratamento com a Ptx elevaram a expressão do RelA, e após o tratamento com a Ptx, o CBA mostrou maior expressão de p52 do que do p50. Os camundongos C57BL/6 na micróglia mantiveram a expressão do RelA que ocorria antes da infecção, mas diminuiu a expressão do p52 após a infecção pelo plasmódio, o mesmo ocorrendo para o grupo Pb+Ptx, nas outras células cerebrais houve predominância do RelA em todos os grupos e no grupo controle o p52 teve maior expressão da molécula p52 do que do p50

Tabela 9 - Dados esquematizados do resultado da curva de sobrevivência, peso, parasitemia, óxido nítrico, corpúsculos lipídicos.

	Infecção pelo plasmódio	Tratamento com a pentoxifilina
Aumentou	<ul style="list-style-type: none"> perda de peso progressiva nos animais C57BL/6 e BALB/c. 	<ul style="list-style-type: none"> sobrevivência e parasitemia nos animais CBA
	<ul style="list-style-type: none"> NO nos animais CBA e C57BL/6 	<ul style="list-style-type: none"> anemia nos animais BALB/c no oitavo dia de infecção
	<ul style="list-style-type: none"> corpúsculos lipídicos nos três modelos 	
Diminuiu		<ul style="list-style-type: none"> NO nos animais C57BL/6
		<ul style="list-style-type: none"> produção de corpúsculos lipídicos nos animais CBA.

Tabela 10 – Dados esquematizados do resultado das citocinas

Citocinas Aumentou Soro	Infecção pelo plasmódio	Tratamento com a Ptx
BALB/c	• FNT- α e IL-6, INF- γ E IL-10	• IL-4
CBA	• FNT- α e IL-6	• FNT- α , IL-6, MCP-1
C57BL6	• FNT- α e IL-6, INF- γ	• FNT- α
Aumentou Homogenato	Infecção pelo plasmódio	Tratamento com a Ptx
BALB/c	• IL-12p70, IFN- γ , IL-4, IL-17A, MCP-1	
CBA	• IL-4, IL-2, IL-10, MCP-1	• IFN- γ
C57BL6	• IL-12p70, IL-17A	• IFN- γ e IL-10
Diminuiu Homogenato	Infecção pelo plasmódio	Tratamento com a Ptx
BALB/c	• IL-6 e IL-2	• IL-6
CBA		• IL-2
C57BL6	• IL-6 e IL-2	• IL-6, IL-17A, IL-2
Diminuiu Sobrenadante	Infecção pelo plasmódio	Tratamento com a Ptx
C57BL6		• FNT- α e a IL-6

Tabela 11 - Dados esquematizados do resultado dos receptores para o FNT- α e das moléculas da via do NF- κ B por modelo.

Micróglia			
C57BL/6 r1FNT	Ptx	>	Pb + Ptx
BALB/c rLTX	Pb	>	Ptx
C57BL/6 TRAF	Pb + Ptx	>	Pb
C57BL/6 NIK	Pb + Ptx	>	Pb
BALB/c I κ B	Controle	>	Pb +Ptx
CBA RelA	Controle	>	Pb
C57BL/6 p50	Controle	>	Ptx
	Controle	>	Pb
	Controle	>	Pb +Ptx
CBA p52	Controle	>	Pb
	Controle	>	Pb +Ptx
C57BL/6 p52	Controle	>	Pb
	Controle	>	Pb +Ptx

Tabela 12- Dados esquematizados do resultado das moléculas da via do NF- κ B por modelo.

Outras células do tecido cerebral			
CBA	FADD	Controle	> Pb
C57BL/6	FADD	Pb +Ptx	> Controle
CBA	TRAFF	Pb	> Controle
CBA	NIK	Controle	> Pb
		Ptx	> Pb
CBA	RelA	Ptx	> Controle

Tabela 13- Dados esquematizados do resultado dos receptores e das moléculas da via do NF- κ B - Comparação entre os grupos dos três modelos.

		Micróglia		
r1FNT	Pb + Ptx	CBA	>	C57BL6
r2FNT	Controle	CBA	>	C57BL6
FADD	Controle	BALB/c	>	C57BL6
TRAFF	Pb + Ptx	C57BL6	>	BALB/c
NIK	Pb + Ptx	C57BL6	>	CBA
		C57BL6	>	BALB/c
JNK	Controle	BALB/c	>	C57BL6
		CBA	>	C57BL6
JNK	Ptx	CBA	>	C57BL6
JNK	Pb + Ptx	BALB/c	>	C57BL6
I κ B	Controle	BALB/c	>	C57BL6
		CBA	>	C57BL6
I κ B	Pb	BALB/c	>	B C57BL6
		CBA	>	C57BL6
p50	Controle	C57BL6	>	CBA
		C57BL6	>	BALB/c
p50	Pb + Ptx	CBA	>	C57BL6
p52	Pb	BALB/c	>	C57BL6

Tabela 14- Dados esquematizados do resultado dos receptores e das moléculas da via do NF- κ B - Comparação entre os grupos dos três modelos.

Células do tecido cerebral				
r2FNT	Controle	C57BL/6	>	BALB/c
rLTX	Controle	C57BL/6	>	CBA
r2FNT	Pb	C57BL/6	>	CBA
		C57BL/6	>	BALB/c
FADD	Controle	BALB/c	>	CBA
FADD	Pb	C57BL/6	>	CBA
TRAFF	Controle	BALB/c	>	CBA
		C57BL/6	>	CBA
NIK	Pb + Ptx	C57BL/6	>	BALB/c
IKB	Pb+ Ptx	C57BL/6	>	BALB/c
RelB	Ptx	CBA	>	C57BL/6
c-Rel	Ptx	C57BL/6	>	CBA
		C57BL/6	>	BALB/c

Tabela 15- Dados esquematizados do resultado da comparação das moléculas por modelo.

Microglia					
Grupo	Controle		Ptx	Pb	Pb + Ptx
BALB/c	rLTX	> r1FNT	r2FNT > rLTX	r2FNT > r1FNT	r2FNT > rLTX
	JNK	> NIK	r2FNT > r1FNT	RelA > RelB	r2FNT > r1FNT
	RelA	> RelB	RelA > RelB	P50 > RelB	JNK > NIK
	P50	> RelB			RelA > RelB
CBA	r2FNT	> r1FNT	r2FNT > r1FNT	r2FNT > r1FNT	rLTX > r1FNT
	JNK	> NIK	RelA > RelB	TRAFF > FADD	RelA > RelB
	RelA	> RelB		RelA > RelB	P50 > RelB
	P50	> RelB		P50 > RelB	P50 > p52
C57BL/6	r2FNT	> r1FNT	r2FNT > r1FNT	r2FNT > rLTX	r2FNT > r1FNT
	NIK	> JNK	NIK > JNK	r2FNT > r1FNT	TRAFF > FADD
	RelA	> RelB	RelA > RelB	NIK > JNK	NIK > JNK
	P50	> RelB	p50 > RelB	RelA > RelB	RelA > RelB
				p50 > RelB	p50 > RelB
			p50 > p52		

Tabela 16- Dados esquematizados do resultado da comparação das moléculas por modelo.

Células do tecido cerebral								
	Controle		Ptx		Pb		Pb + Ptx	
BALB/c	rLTX	> r1FNT	r2FNT	> rLTX	r2FNT	> r1FNT	r2FNT	> rLTX
	NIK	> NK	r2FNT	> r1FNT	P52	> RelB	r2FNT	> r1FNT
	RelA	> RelB	NIK	> JNK			NIK	> JNK
	RelA	> P50	RelA	> RelB			RelA	> RelB
	RelA	> p52	RelA	> p50			RelA	> p50
	p52	> p50	RelA	> p52			RelA	> p52
			p52	> p50			p52	> RelB
						p52	> p50	
CBA	r2FNT	> r1FNT	r2FNT	> r1FNT	r2FNT	> r1FNT	rLTX	> r1FNT
	FADD	> TRAFF	NIK	> JNK	NIK	> JNK	NIK	> JNK
	NIK	> JNK	RelA	> RelB	RelA	> RelB	RelA	> RelB
	RelA	> p50	RelA	> p50	RelA	> p50	RelA	> p50
			RelA	> p52	RelA	> p52	RelA	> p52
		p52	> p50			p52	> p50	
C57B/6	r2FNT	> r1FNT	r2FNT	> r1FNT	r2FNT	> rLTX	r2FNT	> r1FNT
	NIK	> JNK	NIK	> JNK	r2FNT	> r1FNT	NIK	> JNK
	RelA	> RelB	RelA	> RelB	NIK	> JNK		
	RelA	> p50	RelA	> p50	RelA	> RelB		
	p52	> p50	RelA	> p52	RelA	> p50		
			p52	> RelB	RelA	> p52		
		p52	> p50					

DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram a complexidade e individualidade das respostas à infecção pelo plasmódio nos três modelos estudados. Mostraram que a pentoxifilina oral aumentou de forma significativa a sobrevivência dos camundongos CBA, o óxido nítrico estava aumentado nos modelos CBA e C57BL/6, susceptíveis a malária cerebral, no sexto dia de infecção, e a pentoxifilina diminuiu a produção do NO apenas no C57BL/6. O aumento da biogênese dos corpúsculos lipídicos nos animais infectados mostrou que a condição inflamatória, no sexto dia de infecção, estava presente tanto nos modelos suscetíveis quanto resistentes à forma cerebral da malária. E somente no CBA o tratamento com a pentoxifilina diminuiu a produção de corpúsculos lipídicos. Na malária, a hiperativação da resposta inflamatória, particularmente o FNT, pode levar às formas graves da doença, com sequelas neurológicas e até a morte do paciente e a pentoxifilina modula a resposta inflamatória e a produção do FNT. Os dados da literatura dos trabalhos utilizando pentoxifilina na malária humana, mostraram resultados divergentes quanto a seus possíveis efeitos benéficos. Entretanto, os desenhos experimentais eram bem diversos com grupos experimentais muito pequenos para se tirar conclusões. Nosso estudo analisou a influência da pentoxifilina na malária em animais com diferentes susceptibilidades à doença e estudando os efeitos localmente (no homogenato do tecido cerebral) e sistemicamente (no soro e no sobrenadante dos macrófagos peritoneais), analisando se havia diferença na resposta ao tratamento. A dose utilizada foi escolhida de acordo com os dados da literatura, levando em consideração que a utilização de doses mais elevadas teve efeitos colaterais tóxicos e que com a utilização de doses mais baixas não foi verificado efeito colateral do medicamento. Optamos por iniciar o tratamento a partir do terceiro dia para não impedir a resposta imune inicial ao plasmódio. Utilizamos a via oral para o tratamento, pois não está mais disponível a pentoxifilina para utilização por via intramuscular ou intraperitoneal.

Em relação à sobrevivência, o tratamento retardou em um dia a morte dos animais do modelo CBA em relação ao grupo não tratado. Os animais do grupo não tratado começaram a morrer no sexto dia após a infecção,

enquanto os animais do grupo tratado, começaram a morrer no sétimo dia. Entretanto, embora tenha havido aumento da sobrevivência, observamos um aumento em 31% na mediana da parasitemia no grupo dos camundongos CBA tratados com a pentoxifilina, mostrando, que o aumento da sobrevivência nesse modelo não foi devido a um possível aumento nos mecanismos parasiticidas contra o plasmódio, mas possivelmente pela ação moduladora das funções do sistema imunitário.

Nossos dados estão de acordo com as observações de Paula Júnior (2003) e Borges (2006), que trataram camundongos CBA infectados com o *Plasmodium berghei* Anka com 8mg/kg/dia de pentoxifilina, por via intramuscular, e também observaram aumento da sobrevivência dos animais tratados com a droga. Entretanto, o tempo de sobrevivência dos animais observados por Paula Júnior e Borges foi maior do que o observado por nós, possivelmente pela maior idade dos animais estudados por eles, que foi de 2-6 m, enquanto a idade dos nossos animais foi de no máximo 2 meses. Como também, possivelmente por diferenças nas vias de administração e da dose da droga, que diferentemente da nossa, em que os animais foram tratados com 100mg/kg/dia de pentoxifilina, por via oral, no trabalho desses autores o tratamento foi feito na dose de 8 mg/kg/dia de pentoxifilina, por via intramuscular. Kremsner e cols (1991) utilizaram 1mg por dia da pentoxifilina, via intraperitoneal e também observaram aumento da sobrevivência dos camundongos CBA infectados com o *P. berghei* ANKA. Porém, em nosso estudo, a pentoxifilina na dose utilizada não influenciou a sobrevivência dos camundongos BALB/c e C57BL/6. Todavia, aparentemente o tratamento com a Ptx piorou a evolução da doença no modelo BALB/c, pois, o último animal BALB/c do grupo Pb+Ptx morreu no vigésimo primeiro dia da infecção, enquanto 20% dos animais do grupo Pb permaneceram vivos por mais 3 dias. Interessante que os animais BALB/c do grupo tratado, que aparentemente tiveram uma piora com o tratamento com a pentoxifilina, tiveram uma menor parasitemia com diferença de 37,8% em relação ao grupo não tratado no quinto dia de infecção, que foi uma resposta oposta à do modelo CBA. Porém no décimo quinto dia e vigésimo primeiro dia após a infecção, não havia mais

diferença entre os grupos tratados ou não. Esses dados sugerem que, embora a parasitemia seja de importância crucial para a evolução da doença, outros fatores, além da parasitemia, dependentes da resposta individual à infecção, também determinam a gravidade e tipo de evolução das formas clínicas da infecção e o efeito do tratamento com a pentoxifilina seja dependente do perfil de resposta de cada indivíduo e talvez esse seja o motivo da discordância quanto a utilização da pentoxifilina na malária. Os nossos dados está deixando mais claro que na malária os efeitos benéficos da pentoxifilina é dependente do perfil genético de cada indivíduo.

Já para o modelo C57BL/6, a resposta ao tratamento foi melhor, pois 80% dos animais do grupo não tratado morreram no sétimo dia e 20% no oitavo dia, enquanto os animais do grupo tratado morreram 50% no sétimo dia e 50% no oitavo dia. Não houve diferença significativa na parasitemia dos animais do modelo C57BL/6. Assim, para ambos os modelos que apresentam a forma cerebral da malária, a pentoxifilina teve algum efeito benéfico no nosso estudo. Diferentemente dos nossos resultados, Borges (2006) verificou que a pentoxifilina na dose 8mg/kg/dia IM aumentou a sobrevivência e retardou o início da morte dos animais BALB/c, que tinham de 2-6 meses de idade, que começaram a morrer por volta do décimo segundo dia após a infecção. Yoshimoto e cols, (1998), observaram em camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* NK65, que a infecção aumentou a expressão de mRNA do FNT- α e a neutralização do FNT- α conduziu a uma sobrevivência mais prolongada e reduziu a lesão hepática. Borges (2013) sugeriu que os mecanismos patológicos responsáveis pelas alterações neurológicas são diferentes nos modelos C57BL/6 e CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, o que poderia explicar respostas diferentes ao tratamento nesses dois modelos.

Nossos dados foram semelhantes aos de Lou e cols (2001), Pierrot e cols (2003), Borges (2013) e Borges e cols (2017) que mostraram que os camundongos BALB/c apresentaram sobrevivência maior que os animais suscetíveis à malária cerebral (CBA e C57BL/6).

Em nosso estudo não observamos diferença na sobrevivência dos camundongos BALB/c e C57BL/6, porém o perfil de citocinas apresentado pelos dois modelos foi diferente. Interessantemente, nos animais CBA, cujo tratamento com a Ptx aumentou a sobrevivência, também houve maior produção do FNT- α , IL-6 e IFN- γ no soro, que são as citocinas relacionadas com a gravidade da infecção. No sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais houve maior produção de FNT- α e IL-6, entretanto, o nível do FNT- α estava um pouco mais baixo do que o dos outros modelos no CBA. Entretanto, no homogenato do tecido cerebral não houve modificação na produção dessas citocinas, quando analisamos no sexto dia da infecção, o que pode ter contribuído para a melhor resposta ao tratamento no modelo CBA. É possível que a resposta sistêmica com maior produção das citocinas inflamatórias tenha contribuído também para a defesa antiparasitária.

Não houve diferença na mediana do peso desses animais no dia da infecção. Entretanto, a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA promoveu perda de peso progressiva nos animais dos modelos BALB/c e C57BL/6, e o tratamento com a pentoxifilina não modificou essa perda de peso. Entretanto, no modelo CBA não foi observado perda de peso dos animais dos dois grupos infectados tratados ou não com a pentoxifilina.

Diferente dos nossos resultados, Borges (2006) observou uma menor perda de peso nos animais BALB/c tratados com pentoxifilina, porém, no modelo CBA, não houve diferença na perda de peso entre os animais dos grupos tratados e não tratados. Foi sugerido que a menor perda de peso nos animais BALB/c tratados, possivelmente deu-se pela diferente produção de citocinas entre os dois modelos, tais como o FNT- α e a IL-12 (Tracey, 2002; Borges, 2006). Entretanto, em todos os modelos por nós estudados, as citocinas inflamatórias FNT- α e IL-6 estavam elevadas. Já foi demonstrado que o desequilíbrio metabólico causado pela infecção ocasiona uma grande perda de reservas proteicas e energéticas, levando à perda de peso, e que na malária pode estar relacionada a ação de vários mediadores, entre eles citocinas como o FNT- α , IL1, IL-6 e IL-12 (Borges, 2006). Yoshimoto e cols

(1998) observaram que camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* NK65, tratados com anticorpo anti-IL-12 diminuíram a perda de peso. O uso de terapias prolongadas com FNT- α favorece a perda de peso, anemia, anorexia e perdas proteicas e lipídicas em camundongos e foi visto em pacientes com câncer, que o aumento do FNT- α também está relacionado com a perda de peso (Tracey, 2002). Assim é possível que as alterações das citocinas inflamatórias tenham tido um papel na perda de peso observada nos camundongos, e que no modelo BALB/c, o maior tempo de sobrevivência tenha contribuído para a maior perda de peso observada. Entretanto, não está esclarecido por que os camundongos CBA não perderam peso como os camundongos dos outros dois grupos.

A influência do tratamento com a Ptx na anemia foi verificada pela determinação do hematócrito. No terceiro dia de infecção, quando se iniciou o tratamento, não houve diferença entre as medianas do hematócrito entre os grupos tratados ou não dos três modelos estudados. Entretanto, no oitavo dia de infecção, os animais infectados tiveram a mediana do hematócrito menor no grupo tratado com a pentoxifilina no modelo BALB/c, mas o tratamento não modificou a evolução da anemia nos modelos CBA e C57BL/6. Nossos dados em parte foram semelhantes aos observados por Borges (2006), que mostrou que a Ptx não influenciou a evolução da anemia no modelo CBA e no BALB/c. Observamos redução no hematócrito do BALB/c no oitavo dia de infecção em consonância com Roth e Herman (1979) que observaram anemia progressiva em torno do sétimo dia de infecção. Stevenson e cols (1982) observaram que camundongos CBA infectados com *Plasmodium chabaudi* apresentaram anemia em torno do quarto dia da infecção, porém essa anemia não foi progressiva.

Vários fatores estão envolvidos na determinação da anemia na malária, como observamos em todos os modelos estudados. Como a hemólise causada pelo processo de maturação do esquizonte e liberação dos merozoítas, a exaustão da medula hematopoiética e das reservas de ferro, presença de citocinas inflamatórias, como o FNT- α , que promove o declínio

da produção de eritropoetina (Roth e Herman, 1979; Miller e cols, 1989; Chang e Stevenson, 2004). O FNT- α diminui a produção de eritropoetina indiretamente por inibir a produção de IL-10, além de estimular a eritrofagocitose pelos macrófagos (Roth e Herman, 1979; Miller e cols, 1989; Chang e Stevenson, 2004).

Em nosso estudo, todos os modelos aumentaram a produção das citocinas inflamatórias e no BALB/c que aparentemente teve uma piora com o tratamento com a pentoxifilina, cuja evolução da anemia foi mais importante, já apresentava a maior concentração da IL-10 no sobrenadante das culturas dos macrófagos na situação basal, e ocorreu uma diminuição da IL-10 após infecção, e essa concentração não foi influenciada pela Ptx (Figura 20D). Um estudo em área holoendêmica do Quênia comparou a relação entre IL-10 e FNT em crianças com malária e mostrou que uma proporção mais baixa de IL-10 do que TNF- α estava associada à anemia por malária, sugerindo que um desequilíbrio na rede reguladora da citocina IL-10 pode contribuir para a patogênese da anemia da malária (Othoro e cols, 1999; May e cols, 2000). Altos níveis de IL-10 podem sugerir um papel benéfico na redução da resposta inflamatória induzida pelo plasmódio, visto que a IL-10 é um inibidor de macrófagos ativados. Ademais, foi visto que a IL-10 exógena inibiu a produção de citocinas induzida por antígenos da malária por células mononucleares do sangue periférico, como FNT- α , IL1 β e IL-6. Reforçando essa hipótese, a adição de anticorpos anti-IL-10 aumentou significativamente a produção dessas citocinas (HO e cols, 1998; Moore e cols, 2001; Perera e cols, 2013). É possível, portanto, que o desequilíbrio entre as citocinas inflamatórias e antiinflamatórias tenham contribuído para a evolução da anemia nos camundongos por nós estudados.

Nossos dados mostraram que a infecção pelo plasmódio aumentou a expressão dos corpúsculos lipídicos em todos os modelos, mas o aumento no modelo CBA foi mais evidente. Entretanto, nos animais CBA, o tratamento com a pentoxifilina modulou negativamente a produção de corpúsculos lipídicos nesse modelo, enquanto que no C57BL/6, positivamente.

Nossos dados foram semelhantes aos observados por Borges e cols (2017) que mostraram aumento na expressão de corpúsculos lipídicos em todos os modelos, porém, eles observaram que houve diferenças entre as enzimas produzidas dentro dos corpos lipídicos, evidenciadas pelos diferentes níveis de expressão de COX-2 e 5-LOX entre as três linhagens. Enquanto os camundongos CBA exibiram maior expressão de COX-2, os camundongos C57BL/6 exibiram níveis aumentados de COX-2 e 5-LOX nos vasos cerebrais. Estudo *in vitro* mostrou que o *Plasmodium falciparum* pode estimular a formação de corpúsculos lipídicos nos eritrócitos parasitados (Palacpac e cols, 2004; Jackson e cols, 2004), e em estudo anterior, observamos que o tratamento com os antimaláricos artemeter, lumefantrina e mefloquina diminuiu a expressão dos corpúsculos lipídicos por monócitos estimulados por eritrócitos infectados *in vitro* pelo *P. falciparum*, quando a ingestão do parasito ocorreu pelos receptores para padrões moleculares de patógenos. Entretanto, para a lumefantrina e para a mefloquina, observamos resultado oposto, quando o estímulo ocorreu pelos receptores para opsoninas, com aumento da expressão dos corpúsculos lipídicos. Essa diferença nas respostas indica que a expressão dos corpúsculos lipídicos foi dependente da via pelo qual o monócito foi estimulado pelo eritrócito parasitado (Couto, 2015).

Em nosso estudo, o aumento da biogênese dos corpúsculos lipídicos nos animais susceptíveis à malária cerebral ou não, infectados pelo plasmódio, sugere que todos apresentam a condição inflamatória, no sexto dia de infecção, porém em intensidade diferentes.

A infecção pelo plasmódio aumentou as citocinas inflamatórias FNT- α e a IL-6 de modo sistêmico (no soro) em todos os modelos estudados. Porém, o tratamento com a pentoxifilina diminuiu a concentração da IL-6 de modo localizado (no homogenato do tecido cerebral) apenas nos modelos BALB/c e C57BL/6.

Vários estudos mostraram que o desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e de quimiocinas, induzido pelo plasmódio contribui para a patogênese da malária grave (Idro e cols, 2010; Liu e cols, 2012). Neste estudo avaliamos a influência da pentoxifilina nas citocinas do

ramo da imunidade inata (IL-6, IL-12, FNT), da resposta de linfócitos T auxiliar do tipo 1 (IL-12, IL-2, IFN- γ e o FNT- α), auxiliar do tipo 2 (IL-4 e a IL-10), auxiliar do tipo 17 (IL-17) e a quimiocina MCP-1. Em nosso trabalho, a determinação das citocinas foi feita no soro e no sobrenadante das culturas dos macrófagos esperando avaliar a ação sistêmica das citocinas, e no homogenato do tecido cerebral, tentando avaliar sua ação local, no órgão alvo responsável pela forma cerebral mais grave da malária.

Observamos que a infecção pelo plasmódio aumentou a produção das citocinas inflamatórias FNT- α e IL-6 no soro em todos os modelos estudados, entretanto, no homogenato do tecido cerebral, a infecção não modificou a concentração do FNT- α em nenhum modelo, mas diminuiu a concentração da IL-6 apenas nos modelos BALB/c e C57BL/6.

Tem sido descrito que o FNT- α está envolvido nos mecanismos imunopatológicos da malária, com expressão exacerbada na forma cerebral, tanto em camundongos (Lou e cols, 2001; Engwerda e cols, 2005), quanto em humanos (Clark e Cowden, 2003), sendo considerado como o principal marcador inflamatório de malária grave e está intimamente associado a paroxismos de febre, anemia, malária cerebral e muitos outros sintomas de infecção sistêmica (Karunaweera e cols. 1992, Armah e cols. 2005). Nossos dados estão em conformidade com observações prévias, pois mostramos aumento do FNT- α no soro dos camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, no sexto dia de infecção pelo *P.berghei* ANKA. Borges (2006) relatou aumento na produção de FNT- α em camundongos BALB/c, no oitavo dia de infecção, e Hanum e cols (2003) mostraram que a produção de FNT- α foi maior em camundongos BALB/c resistentes à malária cerebral pelo *P. berghei* ANKA, do que em camundongos C57BL/6 susceptíveis. Nossos dados não mostraram diferença significativa na concentração do FNT- α no soro dos três modelos, no sexto dia de infecção. Entretanto no BALB/c resistente, no sexto dia de infecção, os animais apresentavam baixa parasitemia e não tinham alteração no hematócrito.

Também já foi demonstrado que o FNT- α desempenha um papel importante na patogênese da malária cerebral, aumentando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais cerebrais que aumentam a adesão dos eritrócitos parasitados e não parasitados (Grau e cols, 1994; Prakash e cols, 2006). Tem sido sugerido que a diminuição dos níveis séricos do FNT- α pela pentoxifilina confere proteção contra a necrose neuronal e congestão vascular em camundongos CBA (Corazza, 2015). Tem sido sugerido que a produção elevada de FNT- α em pacientes com malária cerebral estaria relacionada à variação genética na predisposição do hospedeiro a produzir essa citocina (Prakash e cols, 2006).

A resposta inflamatória acentuada, o sequestro de eritrócitos, a ativação endotelial e o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica são processos relacionados que podem ter efeitos sinérgicos na expressão clínica da malária cerebral (van der Heyde e cols, 2006). Em consonância com esta hipótese, certas variantes do antígeno de superfície do plasmódio, *PfEMP1*, que estão associadas com malária cerebral, competem a com proteína C na ligação ao receptor da proteína C endotelial (Turner e cols, 2013; Bernabeu e cols, 2016), e as propriedades anti-coagulantes, anti-inflamatórias e citoprotetoras que são induzidas pela interação da proteína C com seu receptor endotelial podem ser inibidas pela interação da *PfEMP1* com esse receptor, exacerbando os mecanismos da doença (Bernabeu e Smith, 2017).

No nosso estudo, o tratamento com a Ptx dos animais infectados pelo plasmódio aumentou ainda mais, no soro dos animais, a concentração do FNT- α nos modelos CBA e C57BL/6, mas não no homogenato cerebral. Enquanto que o tratamento com a Ptx aumentou a concentração da IL-6 no soro somente no modelo CBA, porém, diminuiu a concentração da IL-6 no homogenato do tecido cerebral nos modelos BALB/c e C57BL/6.

Já foi verificado que a pentoxifilina pode diminuir a produção pelos macrófagos das citocinas inflamatórias, FNT- α e IL-6 (Kremsner e cols, 1991; Neuner e cols, 1994). No nosso estudo, apenas no modelo C57BL/6 a Ptx

utilizada em animais não infectados diminuiu a concentração do FNT- α no sobrenadante das culturas dos macrófagos e diminuiu a concentração da IL-6 no sobrenadante das culturas dos macrófagos e no homogenato do tecido cerebral. Diferente dos nossos resultados, Kremsner e cols (1991) observaram que o tratamento com 1mg/dia de pentoxifilina inibiu a expressão do mRNA do FNT- α nos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados com o *P. berghei* ANKA. Além disso, o tratamento com a pentoxifilina diminuiu a produção do FNT- α no soro de crianças com malária cerebral (Di Perri e cols, 1995; Lell e cols, 2010). É possível que a diferença observada entre nossos dados e os de Kremsner e cols tenha sido ocasionada pela dose maior da Ptx utilizada por eles e pela aplicação da droga pela via intraperitoneal nos experimentos desses autores. Todavia, já foi relatado que a pentoxifilina pode ser tóxica em doses elevadas, pois pacientes com malária tratados com 20 mg/Kg/dia de pentoxifilina endovenosa associado com cloroquina tiveram efeitos colaterais causados pela droga, ocasionando a suspensão do tratamento (Hemmer e cols, 1997). Além disso, Kremsner e cols (1991) iniciaram o tratamento no primeiro dia da infecção, enquanto que em nosso trabalho, a Ptx foi iniciada mais tardiamente, para evitar a inibição precoce do FNT- α , pois essa citocina participa dos mecanismos de defesa antiparasitários (Muniz-Junqueira e cols, 2001).

Uma possível mecanismo para explicar a melhor evolução da doença no modelo BALB/c frente a infecção pelo plasmódio poderia estar relacionado com o fato de que esses camundongos apresentaram um nível basal do FNT- α um pouco mais elevado do que o dos outros modelos que desenvolvem a forma cerebral, o que poderia estar facilitando a destruição dos parasitos mais precocemente, pelo seu papel antiparasitário.

Tem sido sugerido que entre os possíveis mecanismos de desenvolvimento das formas mais graves da doença nos modelos CBA e C57BL/6 e em pacientes com malária estaria relacionado ao efeito do FNT- α no endotélio dos vasos, aumentando a expressão de moléculas de aderência no endotélio vascular, estimulando o sequestro de leucócitos e a liberação de

espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que contribuem para o estabelecimento da forma cerebral da malária e que poderia depender da concentração da citocina (Lou e cols, 1998; Hanum e cols, 2003; Hunt e Grau, 2003; Golenser, 2006; Borges, 2006). Entretanto, esse fenômeno parece ser muito mais complexo, e outros fatores devem estar envolvidos, pois os camundongos BALB/c, que não apresentam a forma cerebral, também mostraram aumento do FNT- α após a infecção pelo plasmódio. O mesmo tem sido observado em pacientes com a malária pelo *P. vivax*, que não fazem a forma cerebral da malária, e que também mostram níveis elevados do FNT- α (Karunaweerae cols, 1992).

O FNT- α e a IL-1 induzem macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e célula da glia a secretarem IL-6 (Curfs e cols, 1997). E essa citocina promove a maturação e a ativação de neutrófilos, macrófagos e diferenciação e manutenção de linfócitos T citotóxicos e células NK. Ademais, ativa astrócitos e micróglia, e regula a expressão de neuropeptídeos após lesão neuronal, contribuindo para sua regeneração (Raeburn e cols, 2002). Na malária a IL-6 tem sido associada à patogênese da forma grave (Prakash e cols, 2006; de Oliveira e cols, 2011). Entretanto, como ocorreu com o FNT- α , o modelo BALB/c, que é resistente a forma cerebral da malária, também apresentou aumento nas concentrações da IL-6, após a infecção pelo plasmódio.

Apenas o modelo CBA teve a sobrevida significativamente aumentada pelo tratamento com a Ptx, e nesse modelo, a Ptx aumentou ainda mais o FNT- α e a IL-6 no soro, entretanto, a concentração dessas duas citocinas apresentaram concentrações um pouco menores no homogenato do tecido cerebral e não foram modificadas nem pela infecção pelo plasmódio, nem pelo tratamento com a Ptx. Isso sugere que essas citocinas poderiam estar exercendo efeito protetor sistêmico, mas localmente, no tecido cerebral, sua produção poderia estar sendo regulada.

O aumento das citocinas IL-12 e o INF- γ indica uma resposta de linfócitos T CD4+ auxiliar do tipo 1. Observamos que a infecção pelo

plasmódio aumentou a produção da IL-12p70 apenas nos camundongos dos modelos BALB/c e C57BL/6 no homogenato do tecido cerebral. E para o INF- γ , observamos que a infecção pelo plasmódio induziu aumento dessa citocina no soro dos modelos BALB/c e C57BL/6, e no homogenato do tecido cerebral apenas pelo modelo BALB/c, sugerindo que esses dois modelos (BALB/c e C57BL/6) tiveram uma resposta de linfócitos Ta1 no tecido cerebral em resposta ao plasmódio. O tratamento dos animais infectados com Ptx não modificou a produção da IL-12p70, mas aumentou a produção do INF- γ nos modelos CBA e C57BL/6.

A IL-12p70 logo no início da infecção malárica, estimula a produção de INF- γ pelos linfócitos T CD4+ auxiliar do tipo 1, pelos Linfócitos TC8+ (linfócitos T citolíticos) e pelos citotóxicas naturais (NK) (Doolan e cols, 1999). O INF- γ ativa os fagócitos e induz a produção de NO, que limita o crescimento dos plasmódios no hospedeiro e promove uma imunidade protetora contra a malária cerebral (Cabantous e cols, 2005). Nossos dados mostraram que os animais C57BL/6 e CBA tiveram aumento na concentração do óxido nítrico no sexto dia da infecção. E o tratamento com a Ptx dos animais infectados diminuiu os níveis do NO apenas no modelo C57BL/6. O modelo CBA apresentou maior concentração de óxido nítrico que os outros dois modelos após o tratamento com a Ptx dos animais infectados (grupo Pb+Ptx) e dos animais não infectados (grupo Ptx). O aumento da concentração de NO após o tratamento com a Ptx dos animais não infectados (grupo Ptx) possivelmente ocorreu por diferenças de base genética nesse modelo. Entretanto, além do INF- γ , a produção do NO é estimulada também pelo FNT- γ (Stevenson e cols, 1995; Muniz-Junqueira e cols, 2005), mostrando a complexidade das interações moleculares e celulares na determinação da doença. Deve entretanto ser considerado que dependendo da concentração, o NO pode induzir proteção pela diminuição da carga parasitária, mas em níveis mais elevados, essa espécie reativa de nitrogênio pode induzir lesão tecidual e morte celular (Muniz-Junqueira, 2007).

A IL-4 indica uma resposta de linfócitos T CD4⁺ auxiliar do tipo 2 e é a principal citocina produzida pelos linfócitos CD4⁺ T auxiliar do tipo 2, quando da ativação desses linfócitos. A produção da IL-4 ocorreu em níveis baixos tanto no soro, quanto no homogenato do tecido cerebral dos três modelos do estudo. Após a infecção pelo plasmódio, observamos que o modelo BALB/c mostrou um aumento discreto da IL-4 no homogenato do tecido cerebral, mas os camundongos CBA é que apresentaram uma resposta mais evidente com maior produção da IL-4 no homogenato do tecido cerebral, sugerindo a presença da resposta Ta2 no tecido cerebral no modelo CBA. O tratamento com a Ptx determinou um aumento na produção da IL-4 no soro dos animais infectados apenas no modelo BALB/c. Interessante que os camundongos CBA que mostraram no homogenato do cérebro aumento da IL-4 nos animais infectados pelo plasmódio, mostraram também grande produção do INF- γ tanto no grupo dos animais infectados como naqueles infectados tratados com a Ptx. É possível que nesses animais a infecção desviou a resposta que era do ramo Tauxiliar 2 para o ramo Tauxiliar 1, pois nesse grupo as concentrações do INF- γ foram muito mais elevadas do que as da IL-4, sugerindo que embora tenha havido alguma produção da IL-4, o predomínio da resposta foi do ramo Tauxiliar do tipo 1. Entretanto, como o homogenato foi feito de todo o cérebro dos animais e as respostas imunes são localizadas, não podemos excluir também a possibilidade de que tenha ocorrido uma resposta Ta1 de memória em algumas áreas do cérebro e uma resposta Ta2 de memória em outros locais do tecido cerebral, cujo tipo de resposta dependeu das condições locais no momento da ativação do linfócito.

A IL-17 é a principal citocina produzida pelos linfócitos T CD4⁺ auxiliar do tipo 17. Em nosso estudo, no homogenato do tecido cerebral, os modelos BALB/c e C57BL6 aumentaram a produção da IL-17A em resposta à infecção pelo plasmódio. Entretanto, os níveis da IL-17A foram mais elevados nos homogenato do tecido cerebral dos camundongos C57BL/6, tanto basal, quanto após infecção com o plasmódio. E o tratamento dos animais infectados com a Ptx diminuiu a produção da IL-17A apenas no homogenato do tecido

cerebral dos camundongos C57BL/6. Esses dados sugerem que o modelo C57BL/6 e o modelo BALB/c podem apresentar também uma resposta localizada do tipo T auxiliar 17, no tecido cerebral.

A IL-17 estimula a formação de IL-6, IL-8 e da molécula de adesão intercelular em fibroblastos humanos (Curfs e cols, 1997). Observamos aumento sérico da IL-6 no modelo BALB/c e C57BL/6. Mas isso não foi observado no tecido cerebral, onde verificamos que a infecção pelo plasmódio diminuiu a produção da IL-6. A rede de citocinas na malária é muito complexa e é dependente de vários fatores regulados e contra regulados pela expressão de cada citocina. A IL-17 estimula também a produção de quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos e linfócitos T citolíticos CD8+. Uma possível explicação para essas diferenças seria possivelmente de que nos animais com baixa concentração de IL-17 haveria uma compensação pelo aumento da produção de MCP-1 e conseqüentemente o aumento da produção de FNT- α , IFN- γ e IL-6 que estão envolvidos na gravidade da doença.

Em relação a IL-2 observamos expressão da citocina no soro por todos os modelos, embora em níveis baixos, sugerindo que houve ativação dos linfócitos em todos os modelos. No homogenato do tecido cerebral, a infecção pelo plasmódio elevou a concentração da IL-2 no modelo CBA, mas diminuiu nos modelos BALB/C e C57BL/6, indicando que deve ter havido maior ativação de linfócitos no tecido cerebral no modelo CBA. E o tratamento com a Ptx dos animais infectados diminuiu os níveis da IL-2 nos modelos CBA e C57BL/6.

A IL-2 e IL-12 são mediadores chave da resposta Th1. A IL-12 tem atividade antitumoral, é secretada principalmente por células apresentadoras de antígenos (fagócitos, células dendríticas) em resposta a patógenos, e promove a diferenciação de células CD4+ para o ramo Th1. Células efectoras estimuladas por IL-12 produzem várias citocinas, como IFN- γ e TNF- α (Smyth e cols, 2000). A IL-2 é produzida principalmente por células T CD4+ estimuladas por antígeno (Granucci e cols, 2001), induz a proliferação de

células NK, aumentando sua capacidade citolítica, impulsiona a proliferação e a ativação de células T CD8+ e promove a proliferação de células B e a secreção de anticorpos (Gaffen e cols, 2004). A IL-2 foi originalmente vista como o fator chave para aumentar a resposta imune linfocitária efetora. A administração de IL-2 leva a produção de citocinas pró-inflamatórias como, FNT- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ (Gallagher e cols, 2007; Floros e Tarhini, 2015).

A IL-10 é fundamental na regulação da resposta imune. Na situação basal, os modelos BALB/c e C57BL/6 apresentaram maior concentração da IL-10 do que o modelo CBA no sobrenadante das culturas dos macrófagos. Quando os animais foram infectados pelo plasmódio, a concentração da IL-10 aumentou no soro dos camundongos BALB/c, e no no homogenato do tecido cerebral no modelo CBA. O tratamento com a Ptx dos animais infectados aumentou a produção da IL-10 somente no modelo C57BL/6.

A IL-10 é secretada por células imunológicas e tecidos neuroendócrino e neural. A produção de IL-10 é suprimida por várias citocinas, como IL-4, IL-13 e IFN- γ e também pela sua própria autorregulação (Lin e cols, 2000; Raeburne cols, 2002). A IL-10 inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente FNT- α , IL-1 e IL-6, e estimula a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, intensifica a proliferação de mastócitos e impede a produção de IFN- γ pelas células NK (Curfs e cols, 1997; Zhang e cols, 2007; de Oliveira- silva e cols, 2011).

O papel das citocinas anti-inflamatórias na malária grave permanece controverso, altas concentrações de IL-10 foram associadas com malária grave não cerebral ou com proteção contra malária grave em humanos (Kurtis e cols, 1999; Nussenblatt e cols, 2001; Prakash e cols, 2006). Além disso, foi demonstrado que o equilíbrio entre as concentrações de IL-10 e FNT- α determina a gravidade da anemia em crianças com malária (Othoro e cols, 1999; Prakash e cols, 2006). O FNT- α elevado pode diminuir indiretamente a produção da eritropoetina e pode estimular a eritrofagocitose, agravando a anemia (Clark e Chaudhri, 1988; Miller e cols, 1989; Nussenblatt e cols, 2001; Borges, 2006). Foi observado que perfis de citocinas e quimiocinas em

pacientes na fase aguda da malária pelo *P. vivax* e *P. falciparum* foram caracterizados pela presença de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ , TNF- α) e citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), quimiocinas (IL-8, MIP-1) e G-CSF na maioria dos pacientes com malária (Rodrigues-da-Silva e cols, 2014). Observamos que nos animais BALB/c as concentrações de FNT α , IL-6 e IL-10 estavam elevadas, no sexto dia de infecção pelo *plasmodium berghei* ANKA, e provavelmente o equilíbrio entre aumento na expressão dessas citocinas possa estar relacionado ao perfil genético nesses animais, conferindo resistência à forma cerebral da doença. Nos camundongos susceptíveis à forma cerebral da malária, no C57BL/6 o resultado foi similar ao ocorrido no BALB/c, o aumento na expressão dessas citocinas no modelo C57BL/6, que apresenta um perfil genético diferente do BALB/c, e poderia estar relacionado com o aumento da gravidade da doença nesses animais, pois o mesmo estímulo poderia desencadear respostas diferentes, dependente do perfil de resposta de cada indivíduo.

A infecção pelo plasmódio aumentou a produção da quimiocina MCP-1 no homogenato do tecido cerebral nos modelos BALB/c e CBA, mas apenas no modelo CBA o tratamento com a Ptx dos animais infectados aumentou a produção dessa quimiocina, detectada no soro dos animais.

As citocinas quimiotáticas recrutam linfócitos e monócitos para o local da infecção por ligação a seus respectivos receptores para quimiocinas (Griffith et al., 2014). A MCP-1 produzido por células estromais e imunológicas, se liga a glicosaminoglicanos da matriz extracelular, estabelecendo o tráfego de monócitos/macrófagos para o sítio inflamatório (Proudfoot cols, 2003).

O IFN- γ parece ser essencial para montar uma resposta inicial induzindo quimiocinas e recrutando células T, NK e NKT para o local da infecção, o que pode contribuir para a resposta imunitária local (Liehl e cols, 2014; Miller e cols, 2014). Foi observado em camundongos infectados com *P. yoelii* ou *P. berghei* um aumento na concentração de IFN- γ no fígado (Liehl e cols, 2014; Miller e cols, 2014). Hermsen e cols (2003) também

relataram um aumento na concentração plasmática de IFN- γ antes da fase eritrocitária em pacientes com malária pelo *P. falciparum*. Essa resposta inicial do IFN- γ não foi suficiente para conter o desenvolvimento do estágio hepático, dessa forma os parasitos que conseguiram evadir da resposta imunitária nos hepatócitos migram para corrente sanguínea e rapidamente entraram nos eritrócitos. O aumento na produção do FNT- α , IL-6, IFN- γ e várias outras citocinas inflamatórias está implicado na patogênese de muitas doenças. Vários estudos mostraram resultado positivo na utilização da pentoxifilina como moduladora dessa resposta inflamatória. Foi descrito que na endometriose há aumento sérico de várias citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, FNT- α , IFN- γ . Perello e cols (2016) observaram em camundongos Swiss que a pentoxifilina, nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia, diminuiu as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e FNT- α), com redução do número e tamanho das lesões de endometriose e um aumento na produção de IL-10. Existem relatos de que em pacientes com hepatite C crônica, a terapia com pentoxifilina, 400mg duas vezes ao dia, reduziu os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, como o FNT- α , IL-1 e IL-6 (Gutierrez-Reyes e cols, 2006). Ainda macrófagos alveolares de pacientes com sarcoidose, tratados *in vitro* com pentoxifilina inibiram significativamente a produção de FNT- α e IL-6 estimulada por LPS (Tong e cols, 2003). E o uso de pentoxifilina oral, 400mg, três vezes ao dia, três dias antes da cirurgia em paciente cardíacos, reduziu os níveis de FNT- α e IL-6, o tempo de ventilação e as necessidades de transfusão sanguínea, além de encurtar o tempo de permanência na UTI (Mansourian e cols, 2015).

Nossos dados mostraram que na infecção pelo *Plasmodium berghei* Anka a resposta à infecção e ao tratamento com a Ptx foi muito mais complexa, e dependeu do local de determinação das citocinas e do modelo estudado, particularmente dependente de fatores geneticamente determinados para a resposta do hospedeiro ao parasito. Deve-se considerar também que vários fatores estão envolvidos na produção de citocinas na infecção malárica, e que o processo ocorre na interação entre as células e

depende de quais células e moléculas estão presentes no microambiente onde encontram-se para determinar suas respostas.

Nosso estudo mostrou que a expressão de citocinas e a ação da pentoxifilina na produção dessas citocinas na infecção pelo *Plasmodium berghei* foi diferente nos três modelos por nós estudados. Nossos dados estão em conformidade com Borges (2013), que observou que o curso diferente da malária nos modelos estudados refletiu respostas imunes com diferentes perfis de produção de citocinas, que atuam de maneira coordenada, alterando o equilíbrio fisiológico dos diferentes padrões de respostas, influenciando dessa forma a suscetibilidade à malária cerebral. Entretanto, deve-se considerar que muitos fatores influenciam a produção das citocinas na malária, como por exemplo, pode ocorrer picos de produção das citocinas no momento de rompimento de eritrócitos parasitados, liberando merozoítos na corrente sanguínea. De fato, já foi bem caracterizado que a liberação de moléculas derivadas de parasitas no sangue do hospedeiro devido à ruptura eritrocitária é indutora de FNT- α . *in vitro* e *in vivo* (Kwiatkowski cols, 1989; Bate e Kwiatkowski, 1994). Também já foi observado que durante a infecção pelo *P. vivax*, picos na concentração sérica de FNT- α coincidiram com os períodos de temperatura corporal elevada (Karunaweera e cols, 1992; Dunst e cols, 2017).

Além disso, os níveis plasmáticos aumentados de FNT- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 e redução da produção de IL-4 e TGF- β , foram relatados em pacientes com outras formas de malária grave (Grau e cols, 1994; Prakash e cols, 2006). Por outro lado, o IFN- γ e o FNT- α estão envolvidos em mecanismos efetores que conferem proteção contra a infecção pelo *Plasmodium* (Winkler e cols, 1999; Prakash e cols, 2006).

Para melhor compreensão dos mecanismos de indução das formas graves da malária, analisamos se havia diferença na expressão dos receptores para o FNT/LTX, na micróglia e nas outras células cerebrais, entre os modelos experimentais da malária, suscetíveis ou resistente à forma cerebral da doença, nos quatro grupos de estudo.

Em relação aos receptores para o FNT- α , todos os grupos mostram grande expressão do rLTX e o receptor de menor expressão foi o r1FNT. Nas outras células do tecido cerebral, tanto o r2FNT quanto o rLTX estavam expressos. Na situação basal, os camundongos BALB/c e C57BL/6 tiveram maior expressão do r2FNT do que do rLTX, mas nos camundongos CBA ambos os receptores (r2FNT e rLTX) estavam expressos. Mas após a infecção, os camundongos C57BL/6 passaram a expressar de modo semelhante esses dois receptores, e o tratamento dos animais infectados com a Ptx não modificou significativamente a expressão desses receptores.

Nossos dados são semelhantes às observações prévias de maior expressão do r2FNT do que do r1FNT em camundongos que desenvolvem a malária cerebral. Em camundongos nocautes para esses receptores e de base genética do C57BL/6 foi verificado que o desenvolvimento das formas graves de malária cerebral dependeu dos receptores r2 FNT e rLTX (Lucas e cols, 1997; Togbe e cols, 2008). Engwerda e cols, 2002 observaram aumento da LTX no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei*, com sinais de malária cerebral, e sugeriram que a LTX é produzida localmente por células resistentes à radiação, como células endoteliais que revestem a vasculatura cerebral, células microgliais ou astrócitos no parênquima cerebral (Sedgwick e cols, 2000; Engwerda, 2002; Nishanth e Dirk, 2019). Nossos dados mostraram que tanto os modelos susceptíveis (CBA e C57BL/6) quanto o modelo resistente à forma cerebral (BALB/c) tiveram alta expressão do rLTX na micróglia. Entretanto, Engwerda e cols, 2002, mostraram que camundongos C57BL/6 nocaute para LTX não desenvolveram malária cerebral. O modelo CBA também teve alta expressão do r2FNT na situação basal, mas no homogenato do tecido cerebral foi o modelo C57BL/6 que apresentou níveis maiores da citocina FNT- α , mas após a infecção pelo plasmódio, não houve diferença na produção do FNT- α entre os três modelos. Nossos dados mostraram que houve menor expressão do r1FNT no modelo C57BL/6 do que no CBA após o tratamento com a Ptx dos animais infectados e já foi descrito que a sinalização pelo r1FNT ativa a coagulação local em

pequenos vasos sanguíneos (van der Poll e cols, 1996; Atrekhany e cols, 2020), podendo levar ao desenvolvimento de choque séptico. Como na malária os mecanismos fisiopatogênicos envolvem também os pequenos vasos cerebrais, a maior expressão do receptor 1 poderia influenciar no desenvolvimento da forma cerebral no CBA, mas paradoxalmente, esse modelo, foi o que melhor respondeu ao tratamento com Ptx. Camundongos com deleção de rFNT são resistentes ao choque séptico, mas são suscetíveis a infecções bacterianas (Pfeffer e cols, 1993, Bean e cols, 1999;). Estudos recentes mostraram que o rFNT é necessário para manter a homeostase do sistema nervoso central (Atrekhany e cols, 2018; Atrekhany e cols, 2020) e está envolvido na manutenção funcional dos neurônios (Iosif e cols, 2006; Atrekhany e cols, 2020) e microglia (Gao e cols, 2017, Atrekhany e cols, 2020). Capuccini e cols (2016) observaram importante participação da microglia na malária cerebral, e mostraram que as microglias estão ativadas em camundongos C57BL/6 com malária cerebral pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Os perfis de expressão gênica da microglia extraída nos dia 5 e 7 da infecção apresentaram diferenças em comparação com a microglia de camundongos do grupo controle, que indicavam ativação dessas células. Também foi visto pelo perfil transcriptômico, que essa ativação foi induzida por IFNs Tipo I, sugerindo um papel importante do IFN na ativação e função da microglia durante a malária cerebral. Ademais, mostraram também que microglia de camundongos infectados com um mutante de PbA (Δ DPAP3), que não causa malária cerebral, não foi ativada de forma semelhante, sugerindo que a ativação microglial era uma característica da malária cerebral. Entretanto, nossos dados mostraram que foi o modelo BALB/c, que não apresenta a forma cerebral, que respondeu à infecção pelo plasmódio aumentando o IFN- γ no homogenato do tecido cerebral.

A maior produção de NO pelos animais C57B/6 relacionado com a gravidade da doença, poderia estar relacionada com a mudança na expressão dos receptores após a infecção, mostrando a expressão também do rFNT, que estimula a proliferação celular e está implicado também na inflamação,

por ativar a via do NF- κ B (Lucas e cols, 1997; Borges, 2006). No cérebro, esses camundongos mostraram um perfil de citocinas no ramo Ta17 e aumento das citocinas inflamatórias FNT, IL-6, IFN- γ sistemicamente, que estão envolvidas na gravidade da malária e aumentam a produção de NO.

Nossos dados mostram novamente a complexidade das respostas e indicam novamente que possivelmente são vários os fatores envolvidos no desenvolvimento da forma cerebral, e também reforça que os modelos CBA e C57BL/6 podem apresentar mecanismos diferentes que resultam na mesma expressão clínica da malária cerebral.

Nossos dados mostraram que na micróglia a molécula adaptadora TRAF foi mais expressa no modelo C57BL/6 do que a FADD, que para o modelo CBA as duas moléculas estavam expressas, e no modelo BALB/c, ambas também estavam expressas, mas em níveis um pouco mais elevados do que as do CBA. Entretanto, na micróglia do grupo CBA infectado pelo plasmódio houve maior expressão de TRAF do que FADD. O grupo controle nas outras células cerebrais mostrou maior expressão do FADD. E no modelo C57BL/6 na micróglia houve maior expressão do TRAF no grupo Pb+Ptx. A molécula TRAF controla diversas vias de sinalização, mediada pelos receptores para o FNT, mas também pode se associar a outros receptores com receptores de IL-6 e IL-17, podendo levar a exacerbação da resposta inflamatória (So, 2021). No modelo C57BL/6 que mostrou maior expressão da molécula TRAF, também teve aumento da IL-17 no homogenato do tecido cerebral, sugerindo uma resposta imune localizada no cérebro do ramo Ta17. O TRAF é uma molécula adaptadora do r2FNT, ativado pelo FNT α e ativa a via canônica (So, 2021), que é uma via inflamatória.

A expressão diferente dessas moléculas adaptadoras sugere que as vias intracelulares de ativação do NF- κ B poderiam ser utilizadas diferentemente pelos três modelos experimentais.

Após a ligação às moléculas adaptadoras, há várias moléculas que são ativadas na cascata de ativação da via do NF- κ B, sendo que o NIK é uma das moléculas da via não canônica e o JNK, uma das moléculas da via canônica.

Na micróglia dos camundongos BALB/c e CBA a expressão da molécula JNK foi muito mais evidente do que a molécula NIK, em todos os grupos, entretanto nas outras células cerebrais foi visto o resultado oposto, com predomínio do NIK. Nos camundongos C57BL/6, a expressão de ambas as moléculas foi muito baixa na microglia, mas houve predomínio do NIK, e nas outras células cerebrais a expressão das moléculas foi bem maior que na micróglia, sendo que o predomínio foi do NIK. Foi observado uma predominância absoluta de expressão da molécula JNK na micróglia dos animais BALB/c e CBA em todos os grupos, sendo que no grupo Pb dos camundongos BALB/c, houve também uma discreta expressão da molécula NIK. Nos camundongos C57BL/6, não houve expressão aumentada de nenhuma das duas moléculas, sugerindo a possibilidade de utilização também de outra via para ativação do NF- κ B. Esses dados poderiam sugerir uma tendência para utilização da via canônica preferencialmente na micróglia dos camundongos BALB/c e CBA. E uma tendência para utilização da via não canônica na micróglia pelo modelo C57BL/6. Entretanto, deve ser considerado que pode haver várias comunicação entre as vias que acabam estimulando as mesmas moléculas, as respostas não sendo lineares. Assim, uma resposta inicial por uma molécula pode interagir com moléculas de outras vias passando os estímulos para ativação das moléculas finais por ambas as vias canônica e não canônica e pelos vários receptores.

A molécula I κ B é central na via do NF- κ B, pois é a sua fosforilação que vai liberar a translocação das moléculas finais da via do NF- κ B para o núcleo e ativação ou repressão de genes alvos. Nossos dados mostraram na micróglia que todos os modelos expressaram a molécula do I κ B na situação basal, entretanto, houve menor expressão na situação basal nos camundongos C57BL/6. Após a infecção pelo plasmódio, foi também os camundongos C57BL/6 que apresentaram a menor expressão do I κ B. O tratamento com a Ptx dos camundongos infectados, diminuiu a expressão do I κ B nos camundongos BALB/c e CBA, mas aumentou a expressão da molécula nos camundongos C57BL/6. Nas outras células cerebrais a

expressão da molécula I κ B foi bem menor que na micróglia e apenas no grupo Pb+Ptx o C57BL/6 mostrou maior expressão da molécula que o BALB/c.

Pela análise comparativa da expressão das moléculas finais da via do NF- κ B na micróglia, observamos que o Rel A (via canônica) foi a molécula mais expressa em todos os grupos e o Rel B (via não canônica) teve uma expressão muito baixa na maioria dos grupos e modelos estudados. Nas outras células cerebrais, também houve predomínio da molécula RelA, e apenas no animais infectados pelo plasmódio, no modelo BALB/c houve maior expressão da molécula p52 (via não canônica). Observamos expressão do RelB, apesar de discreta, em todos os grupos. Entretanto, na micróglia e nas outras células cerebrais houve diferença na expressão do RelA entre os modelos. Observamos que na micróglia dos modelos BALB/c e CBA infectado pelo plasmódio a expressão do RelA foi muito menor, tanto em relação ao grupo BALBc e CBA não infectados, como em relação ao modelo C57BL/6 infectado.

Merici e cols, 2020 observaram, utilizando imunohistoquímica, na estrutura tubular renal de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei*, um aumento na expressão do Rel A no sétimo dia de infecção. Esse aumento da expressão de RelA estava correlacionado com o aumento do grau de degeneração tubular, necrose de células tubulares, infiltração intersticial e fibrose.

No grupo Pb+PTX do modelo BALB/c, na micróglia houve expressão também do RelB, embora discreta, o que não ocorreu com os outros modelos. No modelo BALB/c, a expressão do p50 (via canônica) e p52 (via não canônica) na micróglia mostrou-se homogênea, tanto basal, como após o a infecção e o tratamento com a Ptx. Nas outras células cerebrais nesse modelo a expressão do p52 foi maior que a expressão do p50 em todos os grupos. Esses dados sugerem que o modelo BALB/c utiliza ambas as vias de ativação do NF- κ B, canônica e não canônica. O modelo BALB/c é resistente à forma cerebral da malária e morre mais tardiamente de anemia grave, e apresenta uma sobrevida bem maior que os outros dois modelos suscetíveis a forma

cerebral da malária. É possível que a falta das alterações relativas à forma cerebral nesse modelo esteja relacionado à utilização mais ampla e equilibrada das vias do NFκB, tanto pela via canônica como pela via não canônica. Entretanto, em nosso trabalho, a Ptx aparentemente agravou a evolução da doença, na sobrevivência e perda de peso nesse modelo e no oitavo dia de infecção os animais tratados com a Ptx apresentaram anemia maior que os animais do grupo Pb.

Na situação basal (controle) do modelo C57BL6, a expressão do p50 na micróglia mostrou-se um pouco mais elevada do que nos outros grupos, mas após a infecção, houve diminuição do p50 tanto no grupo Pb como Pb+Ptx nesses camundongos. Após a infecção e o tratamento com a Ptx, o grupo BALB/c mostrou na micróglia uma relação mais equilibrada entre as moléculas p50 e p52. Enquanto que nos modelos CBA e C57BL6, houve menor expressão da molécula p52 do que a da p50, sugerindo que nesses modelos, que apresentam a forma grave da malária, deve ter havido uma ativação preferencial da via canônica. Nas outras células cerebrais, no modelo CBA a expressão do p52 estava maior que a expressão do p50 nos grupos Ptx e Pb + Ptx, já os animais C57BL/6 mostraram maior expressão do p52 que do p50 nos grupos controle e Ptx.

Siggers e cols. (2011), mostraram que a via canônica regula o gene responsável pela produção da IL-12. Observamos maior produção de IL-12 no homogenato do cérebro dos animais C57BL/6 e BALB/c infectados com o *Pb*. A expressão diversa dos fatores κB nessas linhagens sugere que a produção desigual de citocinas e de espécies reativas esteja sendo regulada pela formação distinta de dímeros NF-κB, estimulando diferentes produtos gênicos (Hoffmann e cols, 2003; Borges, 2013).

Tem sido observado aumento na ativação da proteína RelA da via canônica do NF-κB em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com malária por *P. vivax* e malária não complicada por *P. falciparum* no dia da internação e no sétimo dia pós-tratamento, entretanto em pacientes com malária grave por *P. falciparum*, esse aumento só foi visto no sétimo dia pós-tratamento. Esses dados foram confirmados por imunofluorescência que

mostrou a translocação da molécula RelA para o núcleo das células. Ainda nesse mesmo estudo foi visto a correlação negativa da expressão da molécula RelA com o nível plasmático de IL-10 em pacientes com malária grave por *P.falciparum* (Wang e cols, 1995; Punsawad e cols, 2012). No CBA, que apresentou uma melhor resposta de sobrevivência pelo tratamento com a Ptx, a expressão do p50 (via canônica) foi maior do que a do p52 (via não canônica).

Em estudo *in vitro* utilizando macrófagos de linhagem celular murina foi visto que após uma hora de estimulação com hemozoína sintética houve uma translocação nuclear máxima de p50 e RelA e em seguida diminuiu ao longo de um período de 4h, indicando que a hemozoína ativa a ligação ao DNA das subunidades p50 e RelA em macrófagos. E de maneira dependente da concentração, no momento da estimulação, ativou positivamente a quimiocina MCP-1 que leva ao recrutamento de macrófagos e monócitos, contribuindo para o agravamento da resposta pró-inflamatória (Jaramillo e cols, 2005; Punsawad, 2013). *In vitro* a fagocitose de hemozoína e trofozoítos por monócitos humanos induziu a ligação do NF- κ B ao DNA após 2h e 24h, e as subunidades p50 e RelA foram encontradas na fração nuclear após fosforilação e degradação do I κ B α (Prato e cols, 2010; Polimen e cols, 2012; Punsawad e cols, 2013).

Como limitações do nosso trabalho, determinamos algumas funções celulares no sobrenante das culturas de células obtidas da cavidade peritoneal, que são enriquecidas de macrófagos, mas essas células não foram especificamente caracterizadas como macrófagos e poderiam conter uma pequena população de outras células da cavidade peritoneal que poderiam também estar contribuindo para produzir as moléculas que foram analisadas no nosso trabalho. Outra limitação foi o fato de que as outras células do tecido cerebral também não foram caracterizadas, como também não foi possível discriminar se houve translocação das moléculas finais da via do NF- κ B para o núcleo.

Em conclusão, nossas observações sugerem que os três modelos de camundongos apresentaram mecanismos imunopatogênicos diferentes e que

a participação das citocinas nesses mecanismos foi dependente do perfil genético de cada modelo, que provavelmente está relacionado com a suscetibilidade individual ao desenvolvimento das forma graves na malária. No homogenato do tecido cerebral dos animais infectados do modelo BALB/c e C57BL/6 mostraram um perfil misto Ta1 e Ta17, e do modelo CBA predominou o perfil Ta2.

O perfil de ativação da via do NF κ B também foi particular para cada modelo com predomínio de ativação da via canônica em todos os modelos, mas nos camundongos BALB/c parece ter havido um maior equilíbrio da resposta com perfil de ativação da via canônica e não canônica de menor intensidade que nos outros modelos e os camundongos CBA utilizam preferencialmente a via canônica e os camundongos C57BL5 expressam moléculas da via canônica de modo mais exacerbado que os camudongos CBA.

Nossos dados mostraram pela primeira vez o perfil de moléculas expressas da via do NF- κ B nos modelos susceptíveis CBA e C57BL/6 e no modelo resistente à forma cerebral da malária e a influência do tratamento com a pentoxifilina. Nossos dados e os dados da literatura sugerem que os efeitos benéficos da pentoxifilina dependeram das características genéticas individuais, da idade, do perfil de resposta imune de cada modelo e da dose e via de aplicação da pentoxifilina, o que possivelmente explique as discordâncias quanto aos efeitos do tratamento com a Ptx nos estudos em modelos experimentais e em pacientes. Seria importante a realização de novos estudos experimentais utilizando a associação de drogas antiparasitárias utilizadas no tratamento da malária com a pentoxifilina como adjuvante aos antiparsitários, nos três modelos estudados. Essa melhor compreensão poderá contribuir para o desenvolvimento de novos estudos com drogas imunomoduladoras com desenhos experimentais mais adequados e que poderão contribuir para diminuir a ainda inaceitável alta morbi-mortalidade pela malária.

CONCLUSÕES

A pentoxifilina oral aumentou de forma significativa a sobrevivência dos camundongos CBA, o óxido nítrico estava aumentado nos modelos CBA e C57BL/6, no sexto dia de infecção, e a pentoxifilina modulou negativamente a produção do NO no modelo C57BL/6.

A infecção aumentou a biogênese dos corpúsculos lipídicos nos animais susceptíveis e resistentes, mas com intensidade diferente nos modelos susceptíveis e no modelo resistente, no modelo CBA foi mais evidente. Mas o tratamento com a Ptx regulou a produção de corpúsculos lipídicos no modelo CBA.

Em relação às citocinas:

Abaixo está sintetizado os resultados das citocinas no soro.

FNT- α

Nos três modelos, o grupo dos animais infectados pelo plasmódio mostrou maior concentração de FNT- α que o grupo controle. Os animais CBA e C57BL/6 do grupo infectado e tratado com a Ptx também mostraram maior concentração da citocina. Não observamos diferença na concentração basal do FNT- α entre os modelos. No grupo dos animais infectados também não foi vista diferença na concentração do FNT- α entre os modelos. No grupo dos animais infectados e tratados com a Ptx o CBA mostrou maior concentração da citocina que o BALB/c.

IL-6

A concentração de IL-6 no grupo controle foi menor no modelo C57BL/6 e maior no CBA. A infecção pelo plasmódio elevou a produção de IL-6 nos três modelos. No CBA o tratamento com a Ptx dos animais infectados (Pb+Ptx) contribuiu para aumentar ainda mais a concentração da citocina. O grupo Pb+Ptx do modelo CBA mostrou maior concentração da citocina que os outros dois modelos.

INF- γ

A infecção pelo plasmódio aumentou a concentração de INF- γ , nos três modelos. No CBA o tratamento dos animais infectados aumentou mais ainda a concentração do INF- γ e nos modelos BALB/c e C57BL/6 o tratamento dos animais infectados não modificou o aumento da concentração de INF- γ ocasionado pela infecção.

IL-10

No BALB/c a infecção pelo plasmódio aumentou a concentração de IL-10, e o tratamento dos animais infectados aumentou a concentração da citocina nos modelos CBA e C57BL/6.

IL-4

No CBA houve uma menor produção da IL-4 após a infecção pelo plasmódio.

IL-17

Pela análise comparativa, houve menor produção da IL-17A no modelo C57BL/6 do que no modelo BALB/c nos animais infectados pelo plasmódio. No grupo dos animais infectados tratados com a Ptx houve maior produção da IL-17A pelo modelo BALB/c do que no modelo C57BL/6.

MCP-1. No grupo Pb+Ptx houve maior produção de MCP-1 pelo modelo CBA.

Abaixo está sintetizado resultados das citocinas nos sobrenadantes das culturas dos macrófagos peritoneais:

FNT- α

Nos três modelos, o grupo dos animais infectados e tratados com a Ptx apresentou maior concentração do FNT- α . Pela análise comparativa entre os modelos, na situação basal (grupo controle), o modelo BALB/c apresentou maior concentração do FNT- α .

IL-6

No grupo controle, o C57BL/6 que apresentou maior concentração da citocina IL-6. O grupo infectado e tratado com a Ptx (Pb+Ptx) do modelo CBA mostrou a maior concentração de IL-6.

IL-10

BALB/c: o grupo controle apresentou maior concentração de IL-10, no CBA a infecção e o tratamento aumentaram a concentração da IL-10.

IL-4

Na situação basal (controle), os camundongos CBA produziram mais IL-4 do que os outros dois modelos. A Ptx determinou um aumento na produção da IL-4 animais infectados (Pb+Ptx) do modelo BALB/c. E nesse grupo (Pb+Ptx), no soro, o modelo BALB/c produziu a maior quantidade da IL-4 e o modelo C57BL/6 a menor.

MCP-1

No sobrenadante das culturas dos macrófagos, observamos que na situação basal (controle normal), o modelo C57BL/6 produziu a maior quantidade da quimiocina e o modelo CBA a menor, entretanto, no grupo (Pb+Ptx) observamos que o BALB/c mostrou maior concentração do MCP-1 que o CBA.

Abaixo está sintetizado os resultados das citocinas no homogenato do tecido cerebral:

FNT- α

Não observamos variações na concentração do FNT- α nos grupos. Pela análise comparativa entre os modelos, no grupo controle o C57BL/6 mostrou maior concentração da citocina. No grupo dos animais infectados e tratados com a Ptx o BALB/c apresentou maior concentração da citocina que o CBA.

IL-6

No grupo controle, o C57BL/6 que apresentou maior concentração da IL-6.

INF- γ .

A infecção pelo plasmódio aumentou a concentração de INF- γ , nos três modelos. No C57BL/6 o tratamento dos animais infectados aumentou mais ainda a concentração do INF- γ e nos modelos BALB/c e C57BL/6 o tratamento dos animais infectados não modificou o aumento da concentração de INF- γ ocasionado pela infecção.

IL-12

A infecção pelo plasmódio modulou a produção de IL-12 nos modelos BALB/c e C57BL/6, que mostraram aumento na concentração da citocina no grupo Pb e a Ptx não influenciou a produção dessa citocina no grupo infectado. O modelo C57BL/6 produziu maior quantidade da citocina do que os outros dois modelos.

IL-10

No BALB/c os animais infectados pelo plasmódio mostrou menor concentração da IL-10. No CBA a infecção pelo plasmódio aumentou a concentração da citocina e o tratamento com a Ptx diminuiu. No C57BL/6 o grupo controle mostrou maior concentração.

IL-2

CBA mostrou a menor concentração da citocina na situação basal e maior concentração nos animais infectados pelo plasmódio. O tratamento com a Ptx dos animais infectados (Pb+Ptx) produziu uma diminuição da IL-2 nos modelos CBA e C57BL/6, mas não alterou o efeito da infecção na produção da IL-2 no modelo BALB/c.

IL-4

Após a infecção pelo plasmódio, houve uma maior produção da IL-4 no pelos camundongos CBA.

IL-17

Após a infecção com o plasmódio tanto o modelo BALB/c, quanto o modelo C57BL/6 produziram uma quantidade maior da IL-17A do que o grupo controle normal. Após o tratamento com a Ptx dos animais infectados com o plasmódio, houve diminuição da produção da IL-17A apenas no modelo C57BL/6. E pela comparação entre os modelos verificamos uma menor produção da IL-17A pelo grupo Pb+Ptx no modelo CBA do que pelo modelo C57BL/6.

MCP-1

No homogenato do tecido cerebral, a infecção pelo plasmódio induziu uma maior produção do MCP-1 nos modelos BALB/c e CBA.

Abaixo estão consideradas as conclusões das citocinas por modelo experimental.

O modelo BALB/c apresentou o perfil das citocinas localmente no cérebro inflamatórias e imunes (IL12, INF- γ e MCP-1), sistemicamente mostrou perfil Ta1, Ta2 e Ta17 (FNT, IL-6, IFN- γ , IL10 e IL-17) .

O modelo CBA mostrou perfil das citocinas localmente no cérebro Ta 1 e Ta2 (IL-2, IL-10, IL4 e MCP-1), sistemicamente mostrou perfil Ta1, Ta2 (FNT- α , IL-10, MCP-1; IL-6, IFN- γ) .

O modelo C57BL/6 mostrou o perfil das citocinas localmente no cérebro Ta1 e Ta 17 (IL-12, IL-17), sistemicamente mostrou perfil Ta1 (FNT- α , IL-6, IFN- γ) .

Em relação aos receptores e moléculas da via do NF- κ B:

Houve menor expressão do r1TNF e maior do rLTX em todos os modelos. O Rel A (via canônica) foi a molécula mais expressa em todos os grupos e o RelB (via não canônica) teve uma expressão desprezível na

maioria dos grupos. No BALBc, a expressão do p50 e p52 mostrou-se homogênea nos grupos. Enquanto que nos modelos CBA e C57BL6, houve menor expressão da molécula p52 do que a p50. No C57BL6 houve maior expressão das moléculas RelA e p50. A infecção pelo plasmódio aumentou a expressão do rLTX no BALB/c, mas diminuiu a expressão de RelA e p52 no CBA, e p50 e p52 no C57BL/6.

A Ptx aumentou a expressão do FADD, mas modulou negativamente expressão a expressão das moléculas RelA e p52.

No C57BL/6 reduziu a expressão p50 e p52, mas aumentou o NIK e TRAF.

No BALB/c modulou negativamente a expressão do RelA.

Nossos dados mostraram a complexidade e individualidade das respostas à infecção pelo plasmódio nos três modelos estudados e o efeito do tratamento com a Ptx foi dependente do modelo e do local que foi analisado.

Para o modelo BALB/c que é resistente a forma cerebral da malária, a pentoxifilina na dose utilizada não influenciou a sobrevivência dos camundongos todavia, aparentemente o tratamento com a Ptx piorou a evolução da doença nesse modelo, pois antecipou a morte de parte dos animais tratados com a droga, entretanto esses mesmos animais tiveram uma menor parasitemia com 37,8% no quinto dia de infecção em relação aos animais do grupo Pb. A infecção promoveu perda de peso nesses animais e aumento da expressão dos corpusculos lipídicos. O tratamento com a Ptx determinou maior anemia nesses animais no oitavo dia de infecção do que nos animais do grupo Pb.

Em relação às citocinas, a infecção determinou: No soro - aumento da concentração de FNT- α , IL-6, IFN- γ , IL-10; No homogenato - aumento da concentração de IFN- γ , IL-12, IL-17A, MCP-1, e diminuiu a produção local de IL-6 e IL-2. O tratamento com a Ptx determinou: No soro - aumentou a concentração de IL-4 e IL-17A no soro em relação ao grupo controle; No homogenato- aumentou a concentração de IL-4 em relação ao grupo controle.

Em relação expressão das moléculas da via do NF- κ B na micróglia: Antes da infecção (grupo controle) o modelo BALB/c mostrou maior expressão da molécula JNK do que da molécula NIK. A infecção determinou maior expressão do receptor para rLTx em relação ao grupo Ptx. O tratamento com a Ptx aumentou a expressão da molécula I κ B em relação ao grupo controle e determinou maior expressão da molécula JNK que da molécula NIK. Na micróglia em todos os grupos o BALB/c mostrou maior expressão do rLTx do que do receptor 1 para o FNT e maior expressão do RelA do que do RelB.

Para o modelo CBA, que apresenta malária cerebral, a pentoxifilina aumentou de forma significativa a sobrevivência dos camundongos, esses animais não tiveram perda de peso progressiva durante a infecção, a infecção pelo plasmódio determinou aumento do óxido nítrico e da expressão dos corpúsculos lipídicos nesse modelo. O tratamento com a Ptx determinou aumento da parasitemia no quinto dia de infecção e diminuiu a expressão dos corpúsculos lipídicos no modelo CBA. Em relação às citocinas, a infecção determinou: No soro - aumento da concentração do FNT- α , da IL-6 e IL-10; No sobrenadante - aumentou a concentração de MCP-1; No homogenato - aumento da concentração de IL-10 e IL-2. O tratamento com a Ptx determinou: No soro - aumentou a concentração de IL-6, IFN- γ , MCP-1 em relação ao grupo controle, aumentou a concentração de IL-10 em relação ao grupo Pb; No sobrenadante - aumentou a concentração de FNT- α em relação aos grupos controle e Pb e diminuiu a concentração de MCP-1 em relação ao grupo Pb; No homogenato- diminuiu a concentração de IL-10 e IL-2; aumentou a concentração de IFN- γ em relação ao grupo controle. Em relação à expressão das moléculas da via do NF- κ B na micróglia: Antes da infecção (grupo controle) o CBA mostrou menor expressão do receptor 1 que os outros dois receptores, mostrou maior expressão do JNK do que do NIK. A infecção determinou maior expressão do receptor para rLTx do que do receptor 1 para o FNT e maior expressão da molécula TRAF do que da molécula FADD e menor expressão da molécula p52. O tratamento com a Ptx

determinou maior expressão do rLTX do que do receptor 1 para o FNT e aumento da molécula FADD. Em todos os grupos o RelA mostrou maior expressão do que o RelB. No grupo Pb+Ptx, o p50 mostrou maior expressão do que o p52.

Para o modelo C57BL/6, que faz a malária cerebral e adocece mais gravemente. A infecção pelo plasmódio promoveu perda de peso, determinou aumento de NO e aumento da expressão dos corpúsculos lipídicos. O tratamento com a Ptx determinou maior perda de peso nesses animais e diminuiu a concentração de NO.

Em relação às citocinas a infecção determinou: No soro - aumento da concentração do FNT- α , da IL-6 e IFN- γ ; No homogenato - aumento da concentração de IL-12, IL-17 A e diminuiu a concentração da IL-2 e IL-6. O tratamento com a Ptx determinou: No soro - aumentou a concentração de IL-10 em relação ao grupo controle. No homogenato- diminuiu a concentração de IL-6 e aumentou a concentração de IFN- γ e diminuiu a concentração de IL-10 em relação ao grupo controle.

Em relação à expressão das moléculas da via do NF- κ B na micróglia: Antes da infecção (grupo controle), o C57BL/6 mostrou maior expressão do rLTx do que do receptor 1. A infecção determinou maior expressão dos receptores para LTX e receptor 2 para o FNT do que para o receptor 1 e maior expressão do p50, determinou menor expressão da molécula p52. O tratamento com a Ptx determinou maior expressão do TRAF do que da molécula FADD. Em todos os grupos o C57BL/6 mostrou maior expressão da molécula NIK que a molécula JNK e maior expressão do RelA do que do RelB.

Tabela 17- Resumo dos resultados da curva de sobrevida, peso, anemia, parasitemia, corpúsculos lipídicos e óxido nítrico.

Modelos	BALB/c		CBA		C57BL/6	
	<i>Pb</i>	<i>Pb</i> +Ptx	<i>Pb</i>	<i>Pb</i> +Ptx	<i>Pb</i>	<i>Pb</i> +Ptx
Curva de sobrevida	~	~	~	↑	~	~
Perda de peso	~	~	~	~	~	↑
Anemia	~	↑	~	~	~	~
Parasitemia	~	~	~	↑	~	~
Corpúsculos Lipídicos	↑	~	↑	~	↑	↓
Óxido nítrico	~	~	↑	~	↑	↓

Seta vermelha voltada para cima indica aumento, seta azul voltada para baixo indica redução e til indica que não houve diferença entre os grupos.

Tabela 18- Resumo dos resultados das citocinas no soro e homogenato.

Citocinas /Modelos	BALB/c		CBA		C57BL/6	
	<i>Pb</i>	<i>Pb</i> +Ptx	<i>Pb</i>	<i>Pb</i> +Ptx	<i>Pb</i>	<i>Pb</i> +Ptx
Soro /Grupos						
FNT- α	↑	~	↑	~	↑	~
IL-6	↑	~	~	~	↑	~
IFN- γ	~	~	~	~	↑	~
IL-12	~	~	~	~	~	~
IL-10	↑	~	~	↑	~	~
IL-2	~	~	~	~	~	~
IL-4	~	~	~	~	~	~
IL17	~	~	~	~	~	~
MCP-1	~	~	~	~	~	~
Homogenato /Grupos						
FNT- α	~	~	~	~	~	~
IL-6	↓	~	~	~	↓	↓
IFN- γ	↑	~	~	~	~	~
IL-12	↑	~	~	~	↑	~
IL-10	~	~	↑	↓	~	~
IL-2	↓	~	↑	↓	↓	~
IL-4	~	~	~	~	~	~
IL17	~	~	~	~	~	~
MCP-1	~	~	~	~	~	~

Seta vermelha voltada para cima indica aumento, seta azul voltada para baixo indica redução e til indica que não houve diferença entre os grupos.

Tabela 19- Resumo dos resultados dos receptores e moléculas da via do NF- κ B.

Modelos	BALB/c		CBA		C57BL/6	
	<i>Pb</i>	<i>Pb +Ptx</i>	<i>Pb</i>	<i>Pb +Ptx</i>	<i>Pb</i>	<i>Pb +Ptx</i>
r1FNT	~	~	~	~	~	~
r2FNT	~	~	~	~	~	~
rLTX	~	~	~	~	~	~
FADD	~	~	~	↑	~	~
TRAF	~	~	~	~	~	↑
NIK	~	~	~	~	~	↑
JNK	~	~	~	~	~	~
I κ B	~	~	~	~	~	~
RelA	~	~	↓	~	~	~
RelB	~	~	~	~	~	~
p50	~	~	~	~	↓	~
p52	~	~	↓	~	↓	~

Seta vermelha voltada para cima indica aumento, seta azul voltada para baixo indica redução e til indica que não houve diferença entre os grupos.

REFERÊNCIAS

- 1- Alves É A R. Influência do tratamento com inibidores da protease do Vírus da Imunodeficiência Humana sobre funções dos macrófagos peritoneais murinos incubados *in vitro* com *Leishmania* (L.) *amazonenses*. Tese de doutorado. Patologia Molecular da Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília; 2013.
- 2- Ângulo I, Fresno M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9: 1145-52; 2002.
- 3- Armah H, Doodoo AK, Wiredu EK, Stiles JK, Adjei AA, Gyasi RK, Tettey Y. High-level cerebellar expression of cytokines and adhesion molecules in fatal, paediatric, cerebral malaria. *Ann Trop Med Parasitol.* 99: 629-647; 2005.
- 4- Atrekhany KN, Mufazalov IA, Dunst J. Intrinsic TNFR2 signaling in T regulatory cells provides protection in CNS autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115:13051-13056; 2018.
- 5- Atrekhany KN, Gogoleva VS, Drutskaya MS, Nedospasov SA. Distinct modes of TNF signaling through its two receptors in health and disease. *J Leukoc Biol.* 107: 893-905; 2020.
- 6- Balachandar S, Katyal A. Peroxisome proliferator activating receptor (PPAR) in cerebral malaria (CM): a novel target for an additional therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30: 483- 498; 2011.
- 7- Baptista FG, Pamplona A, Pena AC, Mota MM, Pied S, Vigarito AM. Accumulation of *Plasmodium berghei*-Infected Red Blood Cells in the Brain Is Crucial for the Development of Cerebral Malaria in Mice. *Infect Immun.* 78:4033-4039; 2010.
- 8- Bate CAW, Taverne J, Playfair JHL: Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology.* 64:227-231; 1988.
- 9- Bate C A and Kwiatkowski D P. Stimulators of tumour necrosis factor production released by damaged erythrocytes. *Immunology.* 83: 256-261;1994.

- 10-Bean AG, Roach DR, Briscoe H, et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol.* 162: 3504-3511; 1999.
- 11-Beermann B, Ings R, Månsby J, Chamberlain J, McDonald A. Kinetics of intravenous and oral pentoxifylline in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 37: 25-28; 1985.
- 12-Bernabeu M, Danziger AS, Avril M, Vaz M, Babar PH, Brazier AJ, Herricks T, Maki JN, Pereira L, Mascarenhas A, Gomes E, Chery L, Aitchison JD, Rathod PK, Smith JD. Severe adult malaria is associated with specific PfEMP1 adhesion types and high parasite biomass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113: e3270 –e3279; 2016.
- 13-Bernabeu M and Smit J D. EPCR and malaria severity: the center of a perfect storm. *Trends Parasitol.* 33: 295–308; 2017.
- 14-Boeuf OS, Loizon S, Awandare GA, Tetteh JK, Addae MM, Adjei GO, Goka B, Kurtzhals JÁ, Puijalón O, Hviid L, Akanmori BD, Behr C. Insights into deregulated TNF and IL-10 production in malaria: implications for understanding severe malarial anaemia. *Malar J.* 11: 1-9; 2012.
- 15-Bopp SER, Ramachandran V, Henson K, Luzader A, Lindstrom M, Spooner M, Steffy BM, Suzuki O, Janse C, Waters AP, Zhou Y, Wiltshire T, Winzeler EA: Genome wide analysis of inbred mouse lines identifies a locus containing ppar- γ as contributing to enhanced malaria survival. *PloS One.* 5: e10903; 2010.
- 16-Borges TKS. Influência da pentoxifilina na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos susceptíveis e resistentes à malária cerebral. Dissertação de Mestrado. Patologia Molecular. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 2006.
- 17-Borges TKS. Mecanismos de resposta inflamatória em modelos murinos de *Plasmodium berghei* ANKA, suscetíveis ou não à malária cerebral. Tese de doutorado. Núcleo de Medicina Tropical. Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília; 2013.

- 18-Borges TKS, Alves EAR, Vasconcelos HAR, Carneiro FP, Nicola AM, Magalhães KG, Muniz-Junqueira MI. Differences in the modulation of reactive species, lipid bodies, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and PPAR- γ in cerebral malaria- susceptible and resistant mice. *Immunobiology*. 222: 604-619; 2017.
- 19-Bozza PT, Bandeira-Melo C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100: 113-120; 2005.
- 20-Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 1791: 540-551; 2009.
- 21-Bozza PT, D'Avila H, Almeida PE, Magalhães K, Almeida C, Molinaro R, Almeida CJ. Lipid droplets in host–pathogen interactions. *Clinical Lipidology*. 4: 791-807; 2009.
- 22-Bozza, PT, Bakker-Abreu, I, Navarro-Xavier, R A, and Bandeira-Melo, C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. Prostaglandins Leukot Essent *Fatty Acids*. 85: 205–213; 2011.
- 23-Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2a ed. Brasília; 2009. Acesso em 29/10/2018.
- 24-Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. –Brasília; Série A. Normas e Manuais Técnicos; 2010. Acesso em 29/10/2018.
- 25-Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_1ed_atual; 2017. Acesso em 29/10/2018.
- 26-Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Guia de tratamento da malária no Brasil [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e

- Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde; 2020. Acesso em 13/04/2021.
- 27-Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico da Malária, 2020. Disponível em: https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2020/dezembro/03/boletim_especial.pdf. Acesso em: 08/04/2021.
- 28-Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A, de Siqueira A M, Júnior C B, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob. Health*. 5: e1038-e1046; 2017.
- 29-Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 15: 362-374; 2015.
- 30-Bueno LL, Morais CG, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta Trop*. 123: 53-57; 2012.
- 31-Cabantous S, Poudiougou B, Traore A, Keita M, Cisse M B, Doumbo O, Dessein A J, Marquet S. Evidence that interferon- γ plays a protective role during cerebral malaria. *J Infect Dis*. 192: 854–860; 2005.
- 32-Cabantous S, Poudiougou B, Oumar AA, Traore A, Barry A, Vitte J, Bongrand P, Marquet S, Doumbo O, Dessein AJ. Genetic evidence for the aggravation of *Plasmodium falciparum* malaria by interleukin 4. *J Infect Dis*. 200: 1530-1539; 2009.
- 33-Campanella GS, Tager AM, El Khoury JK, Thomas SY, Abrazinski TA, Manice LA, Colvin RA, Luster AD. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 4814-4819; 2008.
- 34-Capuccini B, Lin J, Talavera- Lopez C, Khan S M, Sodenkaamp J, Spaccapelo R, Langhorne J. Transcriptomic profiling of microglia reveals signatures of cell activation and immune response, during experimental cerebral malária. *Sci Rep*. 6: 1-11; 2016.

- 35-Cardona AE, Huang D, Sasse ME, Ransohoff RM. Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nat Protoc.*1: 1947-1951; 2006.
- 36-Chang, K H e Stevenson M M. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int J Parasitol.* 34: 1501–1516; 2004.
- 37-Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 115: 3049-3059; 2002.
- 38-Clark I A and Chandhri G. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol.* 70: 99-103;1988.
- 39- Clark I A and Cowden W B. The pathophysiology of *falciparum* malaria. *Pharmacol Ther.* 99: 221–260; 2003.
- 40-Clark IA, Alleva LM, Budd AC, Cowden WB. Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. *Travel Med Infect Dis.* 6: 67-81; 2008.
- 41-Claser C, De Souza JB, Thorburn SG, Grau GE, Riley E M, Renia L, Hafalla JCR. Host resistance to *plasmodium*-induced acute immune pathology is regulated by interleukin-10 receptor signaling. *Infect Immun.* 85: e 00941-16; 2017.
- 42-Cooke BM, Wahlgren M, Coppel RL. *Falciparum* malaria: sticking up, standing out and out-standing. *Parasitol Today.* 16: 416-420; 2000.
- 43-Corazza D. Influência da pentoxifilina na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos susceptíveis ou resistentes às formas graves da malária: aspectos histopatológicos. Dissertação de Mestrado. Brasília; 2015.
- 44-Couper NK, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 180: 5771-7; 2008.
- 45-Couto, SCP. Influência do tratamento com os antiplasmodiais artemeter, lumefantrina e mefloquina em funções dos monócitos envolvidas na defesa contra as formas eritrocitárias do *Plasmodium falciparum*.

- Dissertação de mestrado, Núcleo de medicina tropical. Universidade de Brasília; 2015.
- 46-Craig AG, Grau GE, Janse C, Kazura JW, Milner D, Barnwell JW. Animal models for research on severe malaria: the role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog.* 8:1-9; 2012.
- 47-Crouch S P M and J Fletcher. Effect of ingested pentoxifylline on neutrophil superoxide anion production. *Infect Immun.* 60:4504–4509; 1992.
- 48-Curfs JH, Meis JF Hoogkamp-Korstanje JÁ. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.*10:742-780; 1997.
- 49-Das BK, Mishra S, Padhi PK e cols. Pentoxifylline adjuvant improves prognosis of human cerebral malaria in adults. *Trop Med Int Health.* 8: 680-684; 2003.
- 50-D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, Melo RC, Dosreis GA, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E₂ generation and increased parasite growth. *J Infect Dis.* 204: 951-961; 2011.
- 51-Deininger MH, Kremsner PG, Meyermann R, Schluesener HJ. Focal accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 expressing cells in cerebral malaria. *J Neuroimmunol.* 106: 198-205, 2000.
- 52-De Kossodo, Grau GE. Role of cytokines and adhesion molecules in malaria immunopathology. *Stem Cells*, 11: 41–48;1993.
- 53-de Kossodo S, Monso C, Juillard P, Velu T, Goldman M, Grau GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology.* 91: 536-540;1997.
- 54-de Paula-Júnior 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*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília; 2003.
- 55-de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol.* 61: 255–259; 2011.
- 56-de Oliveira Silva F, das Neves Santos P, de Melo C M L, Teixeira E H, de Sousa Cavada B, Pereira V A R, Almeida A C. Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. *Cell Tissue Res.* 346: 237-244; 2011.
- 57-de Souza J B e Riley E M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect.* 4: 291–300; 2002.
- 58-De Souza JB, Hafalla JC, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology.* 137: 755-72; 2010.
- 59-Di Perri G, Di Perri IG, Monteiro GB, Bonora S, Hennig C, Cassatella M, Micciolo R, Vento S, Dusi S, Bassetti D, Concia E: Pentoxifylline as a supportive agent in the treatment of cerebral malaria in children. *J Infect Dis.* 171: 1317-1322; 1995.
- 60-Dodoo D, Omer FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 185: 971–979; 2002.
- 61-Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery.* 110:192-198; 1991.
- 62-Dondorp AM, Pongponratn E, White NJ. Reduced microcirculatory flow in severe *falciparum* malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Trop.* 89:309–317;2004.
- 63-Doolan D and M Good. Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol.* 11: 412- 419; 1999.

- 64-Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H Fu W, Whitten R O, Milner D, Taylor T E. The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. *Am J Pathol.* 178: 2146-2158; 2011.
- 65-Dunst J, Kamena F, Matuschewski K. Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:324; 2017.
- 66-Engwerda CR, Mynott TL, Sawhney S, De Souza JB, Bickle QD, Kaye PM. Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med.* 195: 1371–1377; 2002.
- 67-Engwerda C, Belnoue E, Gruner AC, Renia L. Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 297: 103–143; 2005.
- 68-Evans K J, Hansen D S, van Rooijen N, Buckingham L A and Schofield L. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood.* 107:1192–1199; 2006.
- 69-Fauconnier M, Palomo J, Bourigault M L, Meme S, Szeremeta F, Beloeil, J C, Quesniaux VFJ. IL-12R β 2 is essential for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol.* 188:1905-1914; 2012.
- 70-Feret, W., Nalewajska, M., Wojczyński, Ł., Witkiewicz, W., Kłos, P., Dziedziejko, V., & Pawlik, A. Pentoxifylline as a Potential Adjuvant Therapy for COVID-19: Impeding the Burden of the Cytokine Storm. *J Clin Med.* 10: 5305; 2021.
- 71-Floros T e Tarhini A. Anticancer cytokines: biology and clinical effects of interferon- α 2, interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin Oncol.* 42: 539–548; 2015.
- 72-Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine.* 28:109–23; 2004.
- 73-Gallagher DC, Bhatt RS, Parikh SM, Patel P, Seery V, McDermott DF, e cols. Angiopoietin 2 is a potential mediator of high-dose interleukin 2–induced vascular leak. *Clin Cancer Res.* 13: 2115-2120; 2007.

- 74-Gama B E, Lacerda M V, Daniel-Ribeiro C T, Ferreira-da-Cruz M F. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.106: 159-166; 2011.
- 75-Gao H, Danzi MC, Choi CS, et al. Opposing functions of microglial and macrophagic TNFR2 in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Rep*. 18:198-212; 2017.
- 76-Garg A and Aggarwal B B. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*. 16: 1053–1068; 2002.
- 77-Ghazanfari N, Mueller SN, Heath WR. Cerebral malaria in mouse and man. *Front Immunol*. 9: 2016; 2018.
- 78-Ghosh S, Sengupta A, Sharma S, Sonawat HM. Metabolic fingerprints of serum, brain, and liver are distinct for mice with cerebral and non-cerebral malaria: A ¹H NMR spectroscopy-based metabonomic study. *J Proteome Res*.11: 4992-5004; 2012.
- 79-Golenser J e cols. Conventional and experimental treatment of cerebral malaria. *Int J Parasitol*. 36: 583–593; 2006.
- 80-Gomes MAM, Neto NCM, Bispo IGA. Interleukin 6, intercellular adhesion molecules 1 and microalbuminuria in the assessment of endothelial damage: literature review. *Rev SOCERJ*. 22: 398–403; 2009.
- 81-Graninger W, Thalhammer F, Locker G. Pentoxifylline in cerebral malaria. *J Infect Dis*. 164: 829-829; 1991.
- 82-Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, e cols. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol*. 2: 882–8; 2001.
- 83-Grau GE, Piguet PF, Pierre Vassalli P, Lambert PH. Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol Rev*. 112:49-70;1989.
- 84-Grau GE, De Kossodo S. Cerebral malaria: mediators, mechanical obstructions or more. *Parasitol Today*. 10:408–9;1994.
- 85-Grau GE, Mackenzie CD, Carr RA, Redard M, Pizzolato G, Allasia C, Cataldo C, Taylor TE, Molyneux ME. Platelet accumulation in brain

- microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis.* 187: 461-466; 2003.
- 86-Grau G E, and Craig A G. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future Microbiol.* 7: 291–302; 2012.
- 87-Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 32:659-702; 2014.
- 88-Guiyedi V, Becavin C, Herbert F, et al. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in children is associated with increased autoantibody production, high IL–10 plasma levels and antibodies to merozoite surface protein 3. *Malar J.* 14:1-11; 2015.
- 89-Gutierrez-Reyes G, Lopez-Ortal P, Sixtos S, Cruz S, Ramirez-Iglesias MT, Gutierrez-Ruiz MC, Sanchez-Avila F, Roldan E, Vargas-Vorackova F, Kershenobich D. Effect of pentoxifylline on levels of pro-inflammatory cytokines during chronic hepatitis C. *Scand J Immunol.* 63 :461–467; 2006.
- 90-Guyatt HL, Snow RW. Malaria in pregnancy as an indirect cause of infant mortality in sub-Saharan Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95: 569–76; 2001.
- 91-Guyatt HL, Snow RW. Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Ver.* 17: 760– 9; 2004.
- 92-Hanum P S, Hayano M, Kojima S. *Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to Plasmodium berghei ANKA infection: early chemokine expression in the brain.* *Int. Immunol.* 15: 633–640; 2003.
- 93-Harada K, Honmou O, Liu H, Houkin K, Kocsis JD, Bando M. Magnetic resonance lactate and lipid signals in rat brain after middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res.* 1134: 206-213; 2007.
- 94-Hawkes M, Elphinstone RE, Conroy AL, Kain KC. Contrasting pediatric and adult cerebral malaria: the role of the endothelial barrier. *Virulence.* 4:543–55; 2013.

- 95-Hearn J, Rayment N, Landon D N, Katz D R and Desouza J B. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immunol.* 68: 5364–5376; 2000.
- 96-Helegbe GK, Huy NT, Yanagi T, Shuaibu MN, Yamazaki A, Kikuchi M, Yasunami M, Hirayama K. Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with *Plasmodium berghei*-ANKA after chronic exposure. *Malar J.* 8:1-13; 2009.
- 97-Hemmer CJ, Hort G, Chiwakata CB, Seitz R, Egbring R, Gaus W, e cols. Supportive pentoxifylline in *falciparum* malaria: no effect on tumor necrosis factor alpha levels or clinical 134 outcome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Am J Trop Med Hyg.* 56:397-403; 1997.
- 98-Hermsen C C, Konijnenberg Y, Mulder L, Loe C, van Deuren M, van der Meer J W, van Mierlo G J, Eling W M, Hack C E and Sauerwein R W. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. *Clin Exp Immunol.* 132: 467–472; 2003.
- 99-Ho M, Schollaardt T, Snape S, Looareesuwan S, Suntharasamai P, White NJ. Endogenous interleukin-10 modulates pro-inflammatory response in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 178:520–5; 1998.
- 100- Honess, D. J., Dennis, I. F., & Bleehen, N. M. Pentoxifylline: its pharmacokinetics and ability to improve tumour perfusion and radiosensitivity in mice. *Radiother Oncol.* 28 :208-218; 1993.
- 101- Hugosson E, Montgomery SM, Premji Z, Troye-Blomberg M, Björkman A. Higher IL- 10 levels are associated with less effective clearance of *Plasmodium falciparum* parasites. *Parasite Immunol.* 26: 111-117; 2004.
- 102- Hunt N H, Grau G E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* 24: 491–499; 2003.
- 103- Idro R, Ndiritu M, Ogutu B, Mithwani S, Maitland K, Berkley J, Crawley J, Fegan G, Bauni E, Peshu N, Marsh K, Neville B, Newton C. Burden,

- features, and outcome of neurological involvement in acute *falciparum* malaria in Kenyan children. *JAMA*. 297: 2232-2240; 2007.
- 104- Idro R, Marsh K, John CC, Newton CR. Cerebral malaria: Mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatr Res*. 68:267–274; 2010.
- 105- Imwong M, Madmanee W, Suwannasin K, Kunasol C, Peto TJ, Tripura R, et al. Asymptomatic natural human infections with the simian malaria parasites *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi*. *J Infect Dis*. 219: 695-702; 2019.
- 106- Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H. Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 26:9703-9712; 2006.
- 107- Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJP, Adisa A, Dogovski C, Tilley L. Food vacuole associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 54: 109–122; 2004.
- 108- Jaramillo M, Godbout M, Olivier M. Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress dependent and - independent mechanisms. *J Immunol*. 174: 475-484; 2005.
- 109- Karin M, Cao Y, Greten F R, Li Z W. NF- κ B in cancer: from an innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2: 301–310; 2002.
- 110- Karunaweera N D, Grau G E, Gamage, P, Carter R and Mendis K N. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 3200–3203; 1992.
- 111- Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R: The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol*. 19:188-193; 2003.
- 112- Kondadasula S V, Roda J M, Parihar R, Yu J, Lehman A, Caligiuri M A, Carson III W E. Colocalization of the IL-12 receptor and Fc γ RIIIa to natural killer cell lipid rafts leads to activation of ERK and enhanced production of interferon- γ . *Blood*. 111: 4173-4183; 2008.

- 113- Kremsner PG, Grundmann H, Neifer S, e cols. Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. *J Infect Dis.* 164: 605-608; 1991.
- 114- Krönke M, Adam-Klages S. Role of caspases in TNF-mediated regulation of cPLA₂. *FEBS Lett.* 531: 18-22; 2002.
- 115- Kriska M, Kristová V, Turcáni P. Pentoxifylline- a pharmacodynamically versatile agent. *Slovakofarma Revue.* 8: 41-47; 1998.
- 116- Kurtis J D, D E, Lanar M, Opollo P E, Duffy. Interleukin-10 responses to liver-stage antigen 1 predict human resistance to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immunol.* 67: 3424; 1999.
- 117- Kurtzhals JA, Addae MM, Akanmori BD e cols. Anaemia caused by asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune African school children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 93:623–627;1999.
- 118- Kwiatkowski D, Cannon J G, Manogue K R, Cerami A, Dinarello C A, and Greenwood B M. Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol.* 77: 361–366; 1989.
- 119- Lacerda-Queiroz. Avaliação da resposta inflamatória cerebral em camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados por *Plasmodium berghei* cepa NK65. [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Pós-graduação em Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas; 2007.
- 120- Lakkavaram A, Lundie R J, Do H, Ward A C, de Koning-Ward T F. Acute *Plasmodium berghei* Mouse Infection Elicits Perturbed Erythropoiesis With Features That Overlap With Anemia of Chronic Disease. *Front Microbiol.* 11; 2020.
- 121- Lapouble OMM, Santelli ACFS, Muniz-Junqueira MI. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. *Rev Panam Salud Publica.* 38: 300–306; 2015.
- 122- Lee KS, Divis PC, Zakaria SK, Matusop A, Julin RA, Conway DJ, Cox-Singh J, Singh B. *Plasmodium knowlesi*: Reservoir Hosts and Tracking the Emergence in Humans and macaques. *PLoS Pathog.* 7: e 1002015; 2011.

- 123- Lehman L G, Vu-Quoc B, Carlson J and Kremsner P G. *Plasmodium falciparum*: inhibition of erythrocyte rosette formation and detachment of rosettes by pentoxifylline. *Tran R Soc Tro. Med Hyg.* 91: 74–75; 1997.
- 124- Leite MS, Pacheco P, Gomes RN, Guedes AT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Koatz VLG. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock.* 23:173–178; 2005.
- 125- Lell B, Kohler C, Wamola B, Olola CH, Kivaya E, Kokwaro G, Wypij D, Mithwani S, Taylor TE, Kremsner PG, Newton CR: Pentoxifylline as an adjunct therapy in children with cerebral malaria. *Malar J.* 9: 1-6; 2010.
- 126- Li J, Yin Q, Wu H. Structural Basis of Signal Transduction in the TNF Receptor Superfamily. *Adv Immunol.* 135-153; 2013.
- 127- Liehl P, Zuzarte-Luis V, Chan J, Zillinger T, Baptista F, Carapau D e cols. Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat Med.* 20: 47–53; 2014.
- 128- Lin E, Calvano SE, Lowry SF – Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 127:117-126; 2000.
- 129- Liu M, Amodu AS, Pitts S, Patrickson J, Hibbert JM, Battle M, Ofori-Acquah SF, Stiles JK. Heme mediated STAT3 activation in severe malaria. *PLoS One.* 7: e 34280; 2012.
- 130- Looareesuwan S, Wilairatana P, Vannaphan S, Wanaratana V, Wenisch C, Aikawa M, Brittenham G, Graninger, Wernsdorfer, W H. Pentoxifylline as an ancillary treatment for severe *falciparum* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 58: 348–353; 1998.
- 131- Lou J N, Gasche Y, Zheng L, Critico B, Monsohinard C, Juillard P, Morel P, Buurman W A and Grau G E. Differential reactivity of brain microvascular endothelial cells to TNF reflects the genetic susceptibility to cerebral malaria. *Eur J Immunol.* 28:3989–4000;1998.
- 132- Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev.* 14: 810-820; 2001.

- 133- Lucas R, Lou J-N, Juillard P, Moore M, Bluethmann H, Grau GE. Respective role of TNF receptors in the development of experimental cerebral malaria. *J Neuroimmunol.* 72:143–148; 1997.
- 134- Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Weinberg JB, Kremsner PG. Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immunol.* 68: 3909-3915; 2000.
- 135- Lyke K, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12 (p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immunol.* 72: 5630–7; 2004.
- 136- Magalhães K, Almeida PE, Atella G, Maya-Monteiro CM, Castro-Faria-Neto H, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Bozza MT, Bozza PT. Schistosomal-derived lysophosphatidyl cholines are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like recepto-2-dependent mechanisms. *J Infect Dis.* 202: 1369-1379; 2010.
- 137- Malaguarnera L, Imbesi R M, Pignatelli S, Simporè J, Malaguarnera M, Musumeci S. Increased levels of interleukin-12 in *Plasmodium falciparum* malaria: correlation with the severity of disease. *Parasite immunol* 24: 387-389; 2002.
- 138- Mandell, Gerald L. Cytokines, Phagocytes, end pentoxifylline. *J Cardiovasc Pharmacol.* s20-s22; 1995.
- 139- Mansourian S, Bina P, Fehri A, Karimi AA, Boroumand MA, Abbasi K. Preoperative oral pentoxifylline in case of coronary artery bypass grafting with left ventricular dysfunction (ejection fraction equal to/less than 30%). *Anatol J Cardiol.*15:1014-9; 2015.
- 140- Marsh K. Malaria – a neglected disease? *Parasitology.* 104: s53–s69; 1992.
- 141- Massart J, Robin MA, Noury F, et al. Pentoxifylline aggravates fatty liver in obese and diabetic ob/ob mice by increasing intestinal glucose

- absorption and activating hepatic lipogenesis. *Br J Pharmacol.* 165: 1361–74; 2012.
- 142- May J, Lell B, Luty AJ, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10: Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis.*182: 1570-1573 ;2000.
- 143- McGOOKEY D J, Anderson R G. Morphological characterization of the cholesteryl ester cycle in cultured mouse macrophage foam cells. *J cell biol.* 97:1156-1168;1983.
- 144- Medana IM, Chan-Ling T, Hunt NH. Reactive changes of retinal microglia during fatal murine cerebral malaria: effects of dexamethasone and experimental permeabilization of the blood–brain barrier. *Am J Pathol.* 156: 1055–65; 2000.
- 145- Melo CRN, D’Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophge lipid body induction by Chagas discase *in vivo*: putative intacellular domains for eicosanoid fomartion during infection. *Tissue Cell.* 35: 59-67; 2003. Parei aqui
- 146- Melo RC, Dvorak AM. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog.* 8: e1002729; 2012.
- 147- Mendis KN, Carter R. Clinical disease and pathogenesis in malaria. *Parasitol Today.* 11: PTI1–PTI5; 1995.
- 148- Merici A, Fitri L E, Budiarti, N. The Effect of Artesunate and Brotowali (*Tinospora Crispa*) Combination on Histopathological, and Expression of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in Renal Tubules of Mice Infected With *Plasmodium Berghei*. *Clin Res J Int Med.* 1: 33-45; 2020.
- 149- Mesquita-Santos FP, Vieira-de-Abreu A, Calheiros AS, Figueiredo IH, Castro-Faria-Neto HC, Weller PF, et al. Cutting edge: prostaglandin D2 enhances leukotriene C4 synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic in vivo role of endogenous eotaxin. *J Immunol.* 176:1326–30; 2006.

- 150- Metenou S, Dembele B, Konate S, Dolo H, Coulibaly YI, Diallo AA, Soumaoro L, Coulibaly ME, Coulibaly SY, Sanogo D, Doumbia SS, Traore SF, Mahanty S, Klion A, Nutman TB. Filarial Infection Suppresses Malaria-Specific Multifunctional Th1 and Th17 Responses in Malaria and Filarial Coinfections. *J Immunol.*186: 4725-4733; 2011.
- 151- Miller KL, Silverman PH, Kullgren B, Mahlmann LJ. Tumor necrosis factor and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun.* 57: 1542–1546;1989.
- 152- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415:673–679; 2002.
- 153- Miller LH, Ackerman HC, Su X, Wellems TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med.* 156-167; 2013.
- 154- Miller J L, Sack B K, Baldwin M, Vaughan A M and Kappe S H. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell Rep.*7: 436–447; 2014.
- 155- Mishra L C, Bhattacharya A, Bhasin V K. Antiplasmodial interactions between artemisinin and triclosan or ketoconazole combinations against blood stages of *Plasmodium falciparum in vitro*. *Am J Trop Med Hyg.* 76: 497–501; 2007.
- 156- Mishra SK, Newton CRJC. Diagnosis and management of the neurological complications of *falciparum* malaria. *Nat Rev Neurol.* 5: 189-198; 2009.
- 157- Mitchell AJ, Hansen AM, Hee L, Ball HJ, Potter SM, Walker JC e cols. Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria. *Infect Immun.* 73:5645-5653; 2005.
- 158- Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Sinalização via sistema NFκ-B. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 8: 227-41; 2016.
- 159- Miu J, Mitchell AJ, Muller M, Carter SL, Manders PM, McQuillan JA, Saunders BM, Ball HJ, Lu B, Campbell IL, Hunt NH. Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J Immunol.* 180: 1217–1230; 2008.

- 160- Mohan A, Sharmab SK, Bollinenic S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis.* 45: 179–193; 2008.
- 161- Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 19:683–765. 2001.
- 162- Morgan M J, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-B signaling. *Cell Res.* 21: 103–115; 2011.
- 163- Muniz-Junqueira MI, Santos-Neto LL, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor- α on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Cell Immunol.* 208: 73-79; 2001.
- 164- Muniz-Junqueira MI, Silva FO, de Paula-Júnior MR, Tosta CE. Thalidomide influences the function of macrophages and increases the survival of *Plasmodium berghei*-infected CBA mice. *Acta Trop.* 94: 128-138; 2005.
- 165- Muniz-Junqueira MI. Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. *Curr Clin Pharmacol.* 1:59-73; 2007.
- 166- Muniz-Junqueira MI, Tosta CE. The pathological bases of immunomodulatory therapy in malaria. *Antibiotiques.* 9: 164-172; 2007.
- 167- Nacher M, Adenis A, Mc Donald S, Do Socorro Mendonca Gomes M, Singh S, Lopes Lima I, et al. Disseminated histoplasmosis in HIV-infected patients in South America: a neglected killer continues on its rampage. *PLoS Negl Trop Dis.* 7: e2319; 2013.
- 168- Neuner P, Klosner G, Schauer E, Pourmojib M, Macheiner W, Grünwald C, Knobler R, Schwarz A, Luger TA, Schwarz T. Pentoxifylline *in vivo* down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology.* 83:262-7;1994.
- 169- Nishanth G, Schlüter D. Blood-Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. *Trends Parasitol.* 35: 516–528; 2019.

- 170- Nussenblatt V, Mukasa G, Metzger A, Ndeezi G, Garrett E, Semba DR. Anemia and interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8:1164–70; 2001.
- 171- Nussler A, Drapier JC, Renia L, Pied S, Miltgen F, Gentilini M, Mazier D. L-Arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin-6 stimulation. *Eur J Immunol.* 21:227–230; 1991.
- 172- O’Dea E, Hoffmann A. The regulatory logic of the NF- κ B signaling system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000216; 2010.
- 173- Oeckinghaus, A., Hayden, M. & Ghosh, S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol.* 12: 695–708; 2011.
- 174- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau J L, Tauil P L, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar j.* 9: 1-15; 2010.
- 175- Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, Udhayakumar V. A low interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J Infect Dis.* 180:1753–5; 1999.
- 176- Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 28: 454-467; 2008.
- 177- Palacpac NM, Hiramane Y, Mi-ichi F, Torii M, Kita K, Hiramatsu R, Horii T, Mitamura T. Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Cell Sci.* 117:1469-1480; 2004.
- 178- Palomo J, Reverchon F, Piotet J et al. Critical role of IL-33 receptor ST2 in experimental cerebral malaria development. *Eur J Immunol.* 45:1354–1365; 2015.
- 179- Penet MF, Viola A, Confort-Gouny S, Le Fur Y, Duhamel G, Kober F, Ibarrola D, Izquierdo M, Coltel N, Gharib B, Grau G E, Cozzone P J. Imaging experimental cerebral malaria *in vivo*: significant role of ischemic brain edema. *J. Neurosci.* 25: 7352–7358; 2005.

- 180- Perelló M, Gonzalez-Foruria I, Castillo P, Martinez-Florensa M, e cols. Oral Administration of Pentoxifylline Reduces Endometriosis-Like Lesions in a Nude Mouse Model. *Reprod Sci.* 24: 911-918; 2017.
- 181- Perera M K, Herath N P, Pathirana S L, Phone-Kyaw M, Alles H K, Mendis K N, Handunnetti S M. Association of high plasma TNF-alpha levels and TNF-alpha/IL-10 ratios with TNF2 allele in severe *P. falciparum* malaria patients in Sri Lanka. *Pathog Glob Health.* 107: 21–29; 2013.
- 182- Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:49-62; 2007.
- 183- Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell.* 73:457-467; 1993.
- 184- Philips M A, Burrows J N, Manyando C, Van Huijsduijnen R H, Van Voorhis W C, Wells T N C. Malaria. *Nat Rev Dis Primers.* 3:17050; 2017.
- 185- Pierrot C, Adam E, Laffite S, Godin C, Dive D, Capron M, Khalife J. Age related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats. *Exp Parasitol.* 104: 81-85; 2003.
- 186- Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, Côrte-Real S, Freire-de-Lima CG, DosReis GA. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect.*11: 181-190; 2009.
- 187- Plebanski M, Hill AV. The immunology of malaria infection. *Curr Opin Immunol.* 12: 437-441; 2000.
- 188- Plewes K, Turner GDH, Dondorp AM. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of coma and acute kidney injury complicating *falciparum* malaria. *Curr Opin Infect Dis.* 31:69-77; 2018.
- 189- Polimeni M, Valente E, Aldieri E, Khadjavi A, Giribaldi G, Prato M. Haemozoin induces early cytokine-mediated lysozyme release from

- human monocytes through p38 MAPK- and NF-kappaB dependent mechanisms. *PLoS One*. 7: 39497; 2012.
- 190- Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave P A, Mishra G C and Pied S. Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum* infected patients from endemic areas of central India. *J Infect Dis*. 194: 198–207; 2006.
- 191- Prato M, Gallo V, Giribaldi G, Aldieri E, Arese P. Role of the NFkappa B transcription pathway in the haemozoin- and 15-HETE mediated activation of matrix metalloproteinase-9 in human adherent monocytes. *Cell Microbiol*. 12: 1780-1791; 2010.
- 192- Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:1885-90; 2003.
- 193- Punsawad SK, Y Maneerat, U Chaisri. Activation of Nuclear Factor Kappa β in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Malaria Patients. *Malar J*. 11:191; 2012.
- 194- Punsawad C. Effect of malaria components on blood mononuclear cells involved in immune response. *Asian Pac J Trop Biomed*. 3: 751–756; 2013.
- 195- Rae C, McQuillan J A, Parekh S B, Bubb WA, Weiser S, Balcar VJ, Hansen A M, Ball HJ, Hunt NH. Brain gene expression, metabolism, and bioenergetics: interrelationships in murine models of cerebral and noncerebral malaria. *FASEB J*. 18: 499–510; 2004.
- 196- Raeburn C D, Sheppard F, Barsness K A, Arya J, Harken A H. Cytokines for surgeons. *Am J Surg*. 183: 268-273; 2002.
- 197- Randall L M, Amante F H, Zhou Y, Stanley A C, Haque A, Rivera F, Pfeffer K, Scheu S, Hill G R, Tamada K, Engwerda C R. (Cutting edge: selective blockade of LIGHT-lymphotoxin beta receptor signaling protects mice from experimental cerebral malaria caused by *Plasmodium berghei* ANKA. *J Immunol*. 181: 7458–7462; 2008b.

- 198- Randall LM, Engwerda CR. TNF family members and malaria: old observations, new insights and future directions. *Exp Parasitol.* 126: 326-331; 2010.
- 199- Randall L M, Kenangalem E, Lampah D A, Tjitra E, Mwaikambo E D, Handojo T, Engwerda CR. A study of the TNF/LTA/LTB locus and susceptibility to severe malaria in highland papuan children and adults. *Malar J.* 9: 1-9; 2010.
- 200- Rasti N, Wahlgren M, Chen Q. Molecular aspects of malaria pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 41: 9–26; 2004.
- 201- Razakandrainibe, R. Combes, V. G.E. Grau, Jambou, R. Crossing the wall: the opening of endothelial cell junctions during infectious diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 45: 1165–1173; 2013.
- 202- Rodrigues-da-Silva RN, Lima-Junior Jda C, e Fonseca Bde P, Antas PR, Baldez A, Storer FL e cols. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109:154–62; 2014.
- 203- Rodríguez NE, Lockard RD, Turcotte EA, Araújo-Santos T, Bozza PT, Borges VM, et al. Lipid bodies accumulation in *Leishmania infantum* - infected C57BL/6 macrophages. *Parasite Immunol.* 39: e12443; 2017.
- 204- Rollins BJ, Morrison ED, Stiles CD. Cloning and expression of JE, a gene by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine like properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 3738-42;1988.
- 205- Roth R L, Herman R. *Plasmodium berghei*: correlation of *in vitro* erythrophagocytosis with the dynamics of early onset anaemia and reticulocytosis. *Exp Parasitol.* 47: 169-79;1979.
- 206- Saeftel M, Krueger A, Arriens S, Heussler V, Racz P, Fleischer B, Brombacher F, Hoerauf A. Mice deficient in interleukin-4 (IL-4) or IL-4 receptor alpha have higher resistance to sporozoite infection with *Plasmodium berghei* (ANKA) than do naive wild-type mice. *Infect Immun.* 72: 322-331; 2004.

- 207- Salluh JI, Pino AV, Silva AR, Gomes RN, Souza HS, e Silva JR, Jandre FC, Giannella-Neto A, Zimmerman GA, Stafforini DM, Prescott SM, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Bozza FA. Lung production of platelet-activating factor acetylhydrolase in oleic acid-induced acute lung injury. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 77:1–8; 2007.
- 208- Sanni LA, Rae C, Maitland A, Stocker R, Hunt NH: Is ischemia involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? *Am J Pathol*.159:1105-1112; 2001.
- 209- Santos- Neto LL, Freitas Santos. Citocinas e endotélio: da homeostasia à lesão pulmonar. Tavares P (Editor). Atualização em fisiologia, respiração. Editora cultuea médica Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 132-144; 1991.
- 210- Sarkar PK, Ahluwalia G, Vijayan VK, Talwar A, Critical Care Aspects of Malaria. *J Intensive Care Med*. 25: 93-103; 2010.
- 211- Schofield L, Grau G E. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 5:722–735; 2005.
- 212- Sedgwick, JD, DS Riminton, JG Cyster and H. Korner. Tumor necrosis factor: a master regulator of leukocyte movement. *Immunol Today*. 21:110–113; 2000.
- 213- Shehata MF. Rel/Nuclear factor-kappa B apoptosis pathways in human cervical cancer cells. *Cancer Cell Int*. 5: 1-13; 2005.
- 214- Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NFkB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res*. 21: 86-102; 2011.
- 215- Siggers T, Chang AB, Teixeira A, Wong D, Williams KJ, Ahmed B, Ragoussis J, Udalova IA, Smale ST, Bulyk ML. Principles of dimer-specific gene regulation revealed by a comprehensive characterization of NF-κB family DNA binding. *Nat Immunol*. 13: 95-102; 2011.
- 216- Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner G D H e cols. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol*.155: 395-410; 1999.

- 217- Smith T, Schellenberg JA, Hayes R. Attributable fraction estimates and case definitions for malaria in endemic areas. *Stat Med.*13: 2345-2358; 1994.
- 218- Smith R V, Waller E S, Doluisio J T, Bauza M T, Puri S K, Ho I, Lassman H B. Pharmacokinetics of orally administered pentoxifylline in humans. *J Pharm Sci.* 75: 47-52;1986.
- 219- Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J immunol.* 165: 2665–70; 2000.
- 220- So T. The immunological significance of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Inter Immunol.* 2021.
- 221- Stevenson M, Lyanga J J, and Skamene E. Murine malaria: genetic control of resistance to *Plasmodium chabaudi*. *Infect. Immun.* 38:80–88;1982.
- 222- Stevenson M M, Tam M F, Wolf SF, Sher A. IL-12 induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol.*155: 2545-2556; 1995.
- 223- Stoltenburg-Didinger G, Neifer S, Bienzle U, e cols. Selective damage of hippocampal neurons in murine cerebral malaria prevented by pentoxifylline. *J Neurol Sci.* 114: 20-24; 1993.
- 224- Tabanez PCR. Influência da talidomida sobre a infecção murina por *Plasmodium berghei* ANKA em modelos susceptíveis ou não à malária cerebral. Tese de mestrado. Patologia Molecular. Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília; 2006.
- 225- Taylor C T, Doherty G, Fallon P G e Cummins E P. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. *J. Clin. Invest.* 126: 3716–3724; 2016.
- 226- Togbe D, De Sousa P L, Fauconnier M, Boissay V, Fick L, Scheu S, Pfeffer K, Menard R, Grau G E, Doan B T, Beloeil J C, Renia L, Hansen A M, Ball H J, Hunt N H, Ryffel B, Quesniaux F. Both functional LTbeta

- receptor and TNF receptor 2 are required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS One*. 3: e 2608; 2008.
- 227- Tong Z, Dai H, Chen B, Abdoh Z, Guzman J, Costabel U. Inhibition of cytokine release from alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis by pentoxifylline: comparison with dexamethasone. *Chest*. 124:1526– 1532; 2003.
- 228- Tosta CE, Muniz-Junqueira MI, Sala-Neto F. Imunologia das relações do plasmódio com o hospedeiro humano. José Rodrigues Coura (editor). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Primeira edição. Rio de Janeiro. Edit Guanab-K. 1: 865-874; 2005.
- 229- Tosta CE, Muniz-Junqueira MI. Malária. Brasileiro-Filho G (editor). Bogliolo Patologia. Ed Guanab K. 1441-1455; 2011.
- 230- Tosta CE, Muniz-Junqueira MI. Malária. Brasileiro-Filho G (editor). Bogliolo Patologia. Ed Guanab K. 1441-1455; 2013.
- 231- Muniz-Junqueira MI, Tosta CE, Borges TKS. Malária. Brasileiro-Filho G (editor). Bogliolo Patologia. Ed Guanab K.1522-1540; 2021.
- 232- Tracey K J. Lethal weight loss: the focus shifts to signal transduction. *Sci STKE*. e21; 2002.
- 233- Tripathi AK, Sullivan DJ, Stins MF. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. *Infect Immunol*. 74: 3262-3270; 2006.
- 234- Tripathi AK, Sha W, Shulaev V, Stins MF, Sullivan Jr DJ. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce NF-kB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. *Blood*. 114: 4243-4252; 2009.
- 235- Turner G. Cerebral malaria. *Brain Pathol*. 7: 569–82; 1997.
- 236- Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JE, et al. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*. 498:502–505; 2013.
- 237- van den Steen PE, Deroost K, Van Aelst I, Geurts N, Martens E, Struyf S, Nie CQ, Hansen DS, Matthys P, Van Damme J, Opdenakker G. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by

- mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. *Eur J Immunol.* 38: 1082-1095; 2008.
- 238- Van der Heyde H C, Batchelder J M, Sandor M, Weidanz W P. Splenic $\gamma\delta$ T cells regulated by CD4⁺ T cells are required to control chronic *Plasmodium chabaudi* malaria in the B-cell-deficient mouse. *Infect Immun.* 74: 2717-2725; 2006.
- 239- Van der Poll T, Jansen PM, Van Zee KJ, et al. Tumor necrosis factor- α induces activation of coagulation and fibrinolysis in baboons through an exclusive effect on the p55 receptor. *Blood.* 88:922-927; 1996.
- 240- Varshosaz J, Minayian M, Moazen E. Enhancement of oral bioavailability of pentoxifylline by solid lipid nanoparticles. *J Liposome Res.* 20: 115 – 123; 2010.
- 241- Vreden SG, van den Broek, MF, Oettinger MC, Verhave JP, Meuwissen JH, Sauerwein RW. Cytokines inhibit the development of liver schizonts of the malaria parasite *Plasmodium berghei* *in vivo*. *Eur J Immunol.* 2: 2271–2275; 1992.
- 242- Vreden SGS, Jitan JK, Bansie RD, Adhin MR. Evidence of an increased incidence of parasitaemia on day 3 in Suriname: an indicator of the emerging resistance of *Plasmodium falciparum* to artemether. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 108: 968–73; 2013.
- 243- Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 33: 19–32; 2001.
- 244- Wan HC, Melo RCN, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J.* 21: 167-178; 2007.
- 245- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM: Interleukin (IL) -10 inhibits the activation of nuclear factor kappa B (NF kappa B) in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem.* 270: 9558-9563; 1995.

- 246- Wang A, Huen S C, Luan H H, Baker K, Rinder H, Booth C J, Medzhitov R. Glucose metabolism mediates disease tolerance in cerebral malária. *Proc Natl Acad Sci USA*.115: 11042-11047; 2018.
- 247- Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. *Drugs* 34: 50-97;1987.
- 248- Wassmer SC, Taylor TE, Rathod PK, Mishra SK, Mohanty S, Arevalo-Herrera M, Duraisingh MT, Smith JD. Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach. *Am J Trop Med Hyg*. 93: 42–56; 2015.
- 249- Wensch C, Looareesuwan S, Wilairatana P, Parschalk B, Vannapann S, Wanaratana V, Wernsdorfer W, Graninger W. Effect of pentoxifylline on cytokine patterns in the therapy of complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 58: 343–347;1998.
- 250- Wensch C, Linnau KF, Looareesuwan S, Rumpold H. Plasma levels of the interleukin-6 cytokine family in persons with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 179: 747-750; 1999.
- 251- White NJ, Turner GD, Medana IM, Dondorp AM, Day NP. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol*. 26: 11-15; 2010.
- 252- Winkler S, Willhem M, Baier K, Schmid D, Aichelburg A. Frequency of cytokine-producing T cells in patients of different age groups with *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*. 179: 209-16; 1999.
- 253- World Health Organization. Malaria in pregnant women. Geneva; 2017
- 254- World malaria report: 20 years of global progress and challenges. Geneva; 2020.
- 255- Wymann M P, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:162–176; 2008.
- 256- Wyska, E., Szymura-Oleksiak, J., Pękala, E., & Obruśnik, A. Pharmacokinetic modelling of pentoxifylline and lisofylline after oral and intravenous administration in mice. *J Pharm Pharmacol*. 59: 495-501; 2007.

- 257- Xiao L, Patterson PS, Yang C, Lal AA. Role of eicosanoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 60: 668-673; 1999.
- 258- Yao Z, Xing L, Boyce BF. NF- κ B p100 limits TNF-induced bone resorption in mice by a TRAF3-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 119:3024-3034; 2009.
- 259- Ye J. Regulation of PPAR gamma function by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 374: 405-408; 2008.
- 260- Yoshimoto T, Takahama Y, Wang CR, Yoneto T, Waki S, Nariuchi H. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. *J Immunol.* 160:5500–5;1998.
- 261- Zhang JM, An J – Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 45:27-37; 2007.
- 262- Zhang G, Manaca MN, McNamara-Smith M, Mayor A, Nhabomba A, Berthoud TK, Khoo SK, Wiertsema S, Aguilar R, Barbosa A, Quintó L, Candelaria P, Schultz EN, Hayden CM, Goldblatt J, Guinovart C, Alonso PL, Lesouëf PN, Dobaño C. Interleukin-10 (IL-10) polymorphisms are associated with IL-10 production and clinical malaria in young children. *Infect Immunol.* 80: 2316-2322; 2012.
- 263- Zakeri-Milani P, Ghanbarzadeh S, Valizadeh H. Comparative in vitro dissolution and in vivo bioequivalence of 2 pentoxifylline sustained release formulations. *Arzneimittelforschung;* 62: 335-339; 2012.

ANEXO 1



Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 11 de fevereiro de 2011.



DECLARAÇÃO



Declaramos que o projeto intitulado **"INFLUÊNCIA DA FILOSSEPTINA 1, DA PENTOXIFILINA, DA PRAVASTATINA, DA TALIDOMIDA E DA DERMOSSEPTINA 01 SOBRE AS VIAS DE ATIVAÇÃO CELULARES ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA MALÁRIA EXPERIMENTAL MURINA."**, UnBDOC nº 43050/2010, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Antonio Sebben
 Coordenador do CEUA



Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 17 de abril de 2020.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"EFEITO DA PENTOXIFILINA COMO IMUNOMODULADORA DAS VIAS DE ATIVAÇÃO CELULARES DETERMINANTES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ANTI-INFLAMATÓRIA NA MALÁRIA CEREBRAL"**, Protocolo n.º 006/2020, sob responsabilidade da Professora Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*, linhagem Swiss (12 machos), C57BL6 (40 machos), BALB/c (40 machos), CBA (40 machos). A presente declaração é válida pelo período de: 31/05/2020 a 31/05/2024.





Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
 Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.