

Shirley Claudino Pereira Couto

**Influência do tratamento com os antiplasmodiais artemeter,
lumefantrina e mefloquina em funções dos monócitos
envolvidas na defesa contra as formas eritrocitárias do
*Plasmodium falciparum***

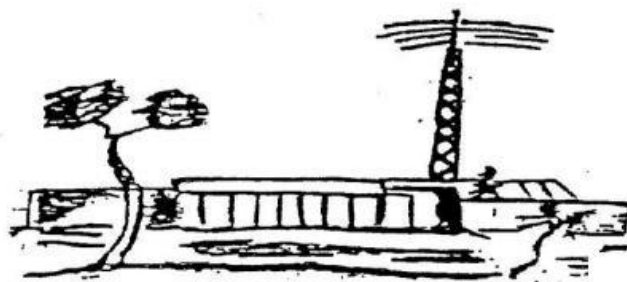
BRASÍLIA/DF

2015

Shirley Claudino Pereira Couto

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



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

BRASÍLIA/DF

2015

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

C871 Claudino Pereira Couto, Shirley
Couti Influência do tratamento com os antiplasmodiais
artemeter, lumefantrina e mefloquina em funções dos
monócitos envolvidas na defesa contra as formas
eritrocitárias do Plasmodium falciparum / Shirley
Claudino Pereira Couto; orientador Maria Imaculada
Muniz Barboza Junqueira. -- Brasília, 2015.
158 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina
Tropical) -- Universidade de Brasília, 2015.

1. antiplasmodiais. 2. ação antiparasitária. 3.
ação imunomoduladora. I. Muniz Barboza Junqueira,
Maria Imaculada, orient. II. Título.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Shirley Claudino Pereira Couto

**Influência do tratamento com os antiplasmodiais artemeter,
lumefantrina e mefloquina em funções dos monócitos
envolvidas na defesa contra as formas eritrocitárias do
*Plasmodium falciparum***

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA- UNB

Medicina Tropical: Biologia das doenças infecciosas e
parasitárias

DATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

20 de julho de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira –UnB
(Presidente)

Prof^a Dr^a Erica Alessandra Rocha Alves- FIOCRUZ- MG
(Banca externo)

Prof^a Dr^a Selma Aparecida Souza Kuckelhaus-UnB
(Banca titular)

Prof Dr Gustavo Sierra Romero- UnB
(Suplente)

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por estar ao meu lado todos os dias da minha 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 por todo carinho e atenção.

À professora Dra. Maria Imaculada, 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 minha amiga e companheira de experimento Mariangela Souza de Oliveira, pelo dedicação e apoio desde o início dessa caminhada.

À professora Tatiana Karla dos Santos Borges, pelo apoio e orientação nos experimentos. A professora Selma Kuckelhaus sempre pronta a ajudar.

À Samara Magalhães, pela amizade e carinho. Helane Catarine Dantas do Nascimento Ribeiro, pela amizade, dedicação e companherismo. Ao Danilo Corazza, pelo apoio sempre que precisei.

Ao Artur Burle Gonçalves pelo auxílio nos experimentos, pela amizade e atenção.

Aos professores do Núcleo de Medicina Tropical, pelos ensinamentos e carinho.

Ao Wallace Santos Cavalcante, meu colega de trabalho, que tanto me ajudou nos experimentos, meu muito obrigada.

Aos estagiários do Laboratório de Imunologia Celular, Elisabete Rodrigues Carrasco Abrão, Débora Pereira de Jesus, Aline de Souza Silva e Ana Carolina Gomes Sardeiro, pelo preparo do material e apoio nos experimentos.

Ao Wagner Mesquita, que gentilmente fez a separação do soro utilizado nas culturas do plasmódio.

Agradecemos especialmente à Coordenação Geral do Plano Nacional de Controle da Malária (CGPNM), do Ministério da Saúde Brasileiro, por ter cedido os medicamentos testados nesse trabalho.

Meu agradecimento especial a todos os voluntários, que gentilmente cederam o sangue que foi utilizado nos experimentos para realização desse trabalho.

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

Muito Obrigada!

APOIO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Apoio ao Hospital Universitário de Brasília (FAHUB) (processo número: 003/2014) e do Ministério de Saúde Brasileiro, que cedeu os medicamentos antimaláricos utilizados para os experimentos *in vitro*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVEATURAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Parasitos e ciclo biológico	3
1.2. Mecanismos de defesa antiplasmódio	5
1.3. Papel da imunidade inata na defesa contra o plasmódio	5
1.4. Drogas antiparasitárias	8
1.5. Ação imunomoduladora de drogas na malária	10
1.6. Justificativa	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Delineamento experimental	17
3.2. Grupos de estudo e aspectos éticos	19
3.3. Cepa do <i>Plasmodium falciparum</i>	20
3.3.1. Preparo dos eritrócitos parasitados para utilização nos testes de fagocitose, expressão de corpúsculos lipídicos, óxido nítrico e peróxido	20

3.4.	Concentrações dos antimaláricos utilizadas nos experimentos <i>in vitro</i>	20
3.5.	Separação dos monócitos por aderência para o teste de fagocitose em placa	21
3.6.	Avaliação da influência das drogas antimaláricas sobre a fagocitose pelos monócitos por meio dos receptores para padrões moleculares de patógenos e receptores para opsoninas	22
3.7.	Expressão de corpúsculos lipídicos quando os monócitos foram incubados com eritrócitos infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> tratados ou não com os antimaláricos	23
3.8.	Influência das drogas antimaláricas, artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a produção <i>in vitro</i> de óxido nítrico	24
3.9	Influência das drogas antimaláricas, artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a produção <i>in vitro</i> de peróxido de hidrogênio	25
3.10.	Análise estatística	26
4.	RESULTADOS	28
4.1.1.	Fagocitose total pelos receptores para padrões moleculares de patógenos	29
4.1.1.1.	Lumefantrina	29
4.1.1.2.	Artemeter	30
4.1.1.3.	Mefloquina	32
4. 1.2.	Fagocitose total pelos receptores para opsoninas	32
4.1.2.1.	Artemeter	32
4.1.2. 2.	Lumefantrina	33

4.1.2.3.	Mefloquina	35
4.2.1.	Fagocitose de hemozoína quando avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos	36
4.2.1.1.	Mefloquina	36
4.2.1.2.	Lumefantrina	37
4.2.1.3.	Artemeter	38
4.2.2.	Fagocitose de hemozoína quando avaliada pelos receptores para opsoninas	38
4.2.2.1.	Artemeter	38
4.2.2.2.	Lumefantrina	39
4.2.2.3.	Mefloquina	40
4.3.1.	Fagocitose de esquizontes quando avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos	41
4.3.1.1.	Lumefantrina	42
4.3.1.2.	Artemeter	43
4.3.1.3.	Mefloquina	43
4.3.2.	Fagocitose de esquizonte quando avaliada pelos receptores para opsoninas	44
4.3.2.1.	Lumefantrina	44
4.3.2.2.	Mefloquina	45
4.3.2.3.	Artemeter	46
4.4.1.	Fagocitose de parasitos na forma em anel pelos receptores para padrões moleculares para patógenos	46
4.4.1.1.	Artemeter	46
4.4.1.2.	Lumefantrina	48

4.4.1.3.	Mefloquina	49
4.4.2.	Fagocitose de parasitos na forma em anel pelos receptores para opsoninas	50
4.4.2.1.	Artemeter	50
4.4.2.2.	Lumefantrina	51
4.4.2.3.	Mefloquina	52
4.5.	Corpúsculos lipídicos	53
4.5.1.	Influencia dos antimaláricos sobre a expressão corpúsculos lipídicos pelos monócitos quando estimulados por eritrócitos parasitados não sensibilizados	54
4.5.1.1.	Artemeter	54
4.5.1.2.	Lumefantrina	55
4.5.1.3.	Mefloquina	56
4.5.2.	Influência dos antimaláricos sobre a expressão de corpúsculos lipídicos por monócitos estimulados com eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> sensibilizados	57
4.5.2.1.	Artemeter	58
4.5.2.2.	Lumefantrina	58
4.5.2.3.	Mefloquina	59
4.6.	Influência dos antimaláricos sobre a produção de óxido nítrico pelos monócitos estimulados ou não com eritrócitos infectados ou não com <i>P. falciparum</i>	60
4.7.	Influência dos antimaláricos sobre a produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos estimulados ou não com eritrócitos infectados ou não com <i>P. falciparum</i>	62
5.	DISCUSSÃO	64

6. CONCLUSÕES	74
6.1 TABELA DE CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS	79
8. ANEXOS	92

LISTA DE ABREVIATURAS

5/LOX	5- lipocigenase
ADN	Acido dextrorribonucleico
ADRP	Proteína reguladora adiposa
ARNm	Acido Ribonucleico mensageiro
CD36	Receptor de limpeza ligante do lipídico de densidade baixa
CGPNCM	Coordenação geral do plano nacional de controle da Malária do ministério da saúde brasileiro.
CMN	Células mononucleares
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO₂	Gás Carbônico
COX-2	Ciclogenase- 2
CPH	Complexo principal de histocompatibilidade
CR	Receptor do complemento
FAHUB	Fundação de Apoio ao Hospital Universitário de Brasília
FNT	Fator de necrose tumoral
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
IC	Índice corpuscular

ICAM	Molécula de adesão intercelular
IF	Índice fagocitário
IFN	Intérferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interlucina
IMC	Índice de massa corporal
LPS	Lipopolissacarideo
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCL	Média de corpúsculos lipídicos
MS	Ministério da Saúde
MYD88	Proteína do gene da resposta primária mieloide 88
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κ B	Fator nuclear kapa B
NKT	Células T inariantes Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PECAM	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PfEMP	Proteína de citoaderência ligada ao gene assexual do <i>plasmodium</i>

PKC	Proteína cinase C
PPAR	Receptor ativado pelo proliferador do peroxissoma
rPMP	Receptores para padrões moleculares de patógenos
SFB	Soro fetal bovino
STAT	Sinal de transdução e ativador da transcrição
STF	Salina tamponada com fosfato
SVS	Serviço de Vigilância Sanitária
TAG	Triacilglicerol
TLR	Receptores semelhantes a toll
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
WHO	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS e TABELAS

Figura 1	18
Fluxograma dos experimentos	
Figura 2	30
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com lumefantrina sobre a fagocitose por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 3	31
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com artemeter sobre a fagocitose por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 4	32
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com mefloquina sobre a fagocitose por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 5	33
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com artemeter sobre a fagocitose por monócitos pelos (rOps)	
Figura 6	34
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com lumefantrina sobre a fagocitose por monócitos pelos (rOps)	
Figura 7	35
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com mefloquina sobre a fagocitose por monócitos pelos (rOps)	
Figura 8	36
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com mefloquina sobre a fagocitose de hemozoína por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 9	37
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com lumefantrina sobre a fagocitose de hemozoína por monócitos pelos (rPMP)	

Figura 10	38
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com artemeter sobre a fagocitose de hemozoína por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 11	39
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com artemeter sobre a fagocitose de hemozoína por monócitos pelos (rOps)	
Figura 12	40
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com lumefantrina sobre a fagocitose de hemozoína por monócitos pelos (rOps)	
Figura 13	41
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com mefloquina sobre a fagocitose de hemozoína por monócitos pelos (rOps)	
Figura 14	42
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com lumefantrina sobre a fagocitose de esquizonte por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 15	43
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com artemeter sobre a fagocitose de esquizonte por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 16	44
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com mefloquina sobre a fagocitose de esquizonte por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 17	45
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com lumefantrina sobre a fagocitose de esquizontes por monócitos pelos (rOps)	
Figura 18	46
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com mefloquina sobre a fagocitose de esquizontes por monócitos pelos (rOps)	

Figura 19	47
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com artemeter sobre a fagocitose de esquizontes por monócitos pelos (rOps)	
Figura 20	48
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com artemeter sobre a fagocitose de plasmódio na forma de anel por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 21	49
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com lumefantrina sobre a fagocitose de plasmódio na forma de anel por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 22	50
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com mefloquina sobre a fagocitose de plasmódio na forma de anel por monócitos pelos (rPMP)	
Figura 23	51
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com artemeter sobre a fagocitose de plasmódio na forma de anel por monócitos pelos (rOps)	
Figura 24	52
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com lumefantrina sobre a fagocitose de plasmódio na forma de anel por monócitos pelos (rOps)	
Figura 25	53
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com mefloquina sobre a fagocitose de plasmódio na forma de anel por monócitos pelos (rOps)	
Figura 26	55
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com artemeter sobre a expressão de corpúsculos lipídicos estimulados pelos (rPMP)	
Figura 27	56

Influência do tratamento <i>in vitro</i> com lumefantrina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos estimulados pelos (rPMP)	
Figura 28	57
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com mefloquina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos estimulados pelos (rPMP)	
Figura 29	58
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com artemeter sobre a expressão de corpúsculos lipídicos estimulados pelos (rOps)	
Figura 30	59
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com lumefantrina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos estimulados pelos (rOps)	
Figura 31	60
Influência do tratamento <i>in vitro</i> com mefloquina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos estimulados pelos (rOps)	
Figura 32	61
Influência do tratamento <i>in vitro</i> , com lumefantrina (A), mefloquina (B) e artemeter (C), sobre a produção de NO	
Figura 33	63
Influência do tratamento <i>in vitro</i> , com lumefantrina (A), mefloquina (B) e artemeter (C) sobre a produção de H ₂ O ₂	
Tabela 1	78
Resumo das conclusões	

RESUMO

A malária continua sendo um importante problema de saúde pública mundial acometendo milhões de pessoas principalmente nas regiões tropicais, e resulta em aproximadamente em 600 mil mortes por ano. As drogas antimaláricas influenciam indiretamente as respostas do sistema imunitário pela capacidade de diminuir a carga parasitária, diminuindo a quantidade de antígenos capazes de ativar o sistema imunitário. Entretanto, ainda está pouco esclarecida a ação das drogas antiplasmodiais sobre os mecanismos de defesa contra o plasmódio. A fagocitose encontra-se entre os principais mecanismos de eliminação do parasito, principalmente pela produção de radicais de oxigênio e nitrogênio pelos monócitos. A biogênese dos corpos lipídicos encontra-se aumentada na malária e pode estar envolvida na defesa e na fisiopatogenia da malária grave. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do efeito imunomodulador do artemeter, lumefantrina e mefloquina na malária, pela avaliação da influência dessas drogas na fagocitose das formas eritrocitárias do plasmódio, na produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio e na biogênese de corpos lipídicos. A influência do artemeter, da lumefantrina ou da mefloquina sobre a fagocitose por monócitos de indivíduos normais foi avaliada *in vitro* utilizando 10^6 eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum*, pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (rPMP) e pelos receptores para opsoninas (rOps). Os monócitos e/ou os eritrócitos foram tratados previamente com as drogas por 60 min. O índice fagocitário foi determinado pela média de eritrócitos parasitados ingeridos por monócito multiplicado pela proporção de monócitos envolvidos na fagocitose. A produção de óxido nítrico foi avaliada pela reação de Griess e a produção de peróxido de hidrogênio foi avaliada pela oxidação do vermelho fenol na presença de peroxidase, sendo os monócitos estimulados pelos eritrócitos parasitados. Os corpúsculos lipídicos foram avaliados pela coloração com Oil Red O. As drogas foram utilizadas *in vitro* considerando os picos séricos observados quando do tratamento *in vivo*, sendo 360 ng/mL para o artemeter, 4,9µg/mL para a lumefantrina e 687ng/mL para a mefloquina. Quando foi feito o tratamento dos monócitos e dos eritrócitos com o artemeter, observamos diminuição no IF quando avaliado pelos rOps (7,6x 5,2) ($p=0,02$). A diminuição da fagocitose foi semelhante quando quantificada para hemozoína ($p=0,036$). Para a lumefantrina, houve diminuição do IF de 8,4 para 4,6 ($p=0,02$), quando apenas os monócitos foram tratados e a fagocitose avaliada pelos rPMP. Também houve diminuição do IF para esquizontes pelos rPMP, quando apenas os monócitos foram tratados ($p=0,006$). Quando os monócitos foram estimulados com os eritrócitos parasitados pelos rPMP, as três drogas diminuíram a expressão de corpúsculos lipídicos ($p<0,05$). Entretanto, quando os monócitos foram estimulados com os eritrócitos infectados sensibilizados, pelos receptores para opsoninas, houve aumento

da expressão dos corpúsculos lipídicos pelo tratamento com a lumefantrina e a mefloquina ($p < 0,05$). O estímulo dos monócitos com os eritrócitos parasitados aumentou a produção de peróxido de hidrogênio ($p = 0,009$). E a mefloquina diminuiu a produção basal de H_2O_2 pelos monócitos ($p < 0,05$). A diminuição da expressão de corpúsculos lipídicos nos monócitos estimulados com eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* pelos rPMP e seu aumento pelos rOps indica que a expressão dos corpúsculos lipídicos foi dependente da via pelo qual o monócito foi estimulado pelo eritrócito parasitado. A lumefantrina deprimiu a fagocitose dos eritrócitos parasitados pelos rPMP, enquanto a depressão da fagocitose ocasionada pelo artemeter foi dependente da ingestão do parasito pelos receptores para complemento. Nossos dados mostraram que o artemeter, a lumefantrina e a mefloquina modulam as respostas dos monócitos aos eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* em aspectos fundamentais relacionados com a defesa inata, nas interações iniciais do parasito com as células de defesa do hospedeiro. Mostrando, portanto, que a ação desses fármacos não depende exclusivamente de sua atividade antiparasitária, mas que o resultado final da ação desses medicamentos depende também da modulação de diversos mecanismos de defesa inato contra o parasito.

ABSTRACT

Malaria remains a worldwide public health issue, affecting millions of people, especially those living in tropical regions. Statistics confirm the magnitude of this disease, with, approximately, 600 thousand deaths each year. Antimalarial drugs indirectly influence immune response through its capacity to reduce parasite load, reducing the quantity of antigens that are capable of activating immune system. However, the role played by antiplasmodial drugs on defense against *Plasmodium* is still not well established. Phagocytosis remains one of the main mechanisms of eliminating parasites, especially through production of radical oxygen and nitrogen molecules by monocytes. The lipid body biogenesis is also enhanced in malaria e may be involved in defense and pathophysiology of severe disease. Therefore, the objective of the current study was to evaluate the immunomodulatory effect of arthemeter, lumefantrine and mefloquine drugs in malaria, based on the role of these drugs on phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, on the production of nitric oxide and hydrogen peroxide and on the biogenesis of lipid bodies. The influence of arthemeter, lumefantrine and mefloquine on phagocytosis by monocytes in healthy individuals was evaluated *in vitro* using 10^6 *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, through pathogen-associated molecular pattern receptors (PAMP_r) or opsonin receptors. Monocytes and/or erythrocytes were previously treated with the drugs for 60 minutes. The phagocytic index was determined by the product of the mean number of parasitized erythrocytes ingested by monocyte and the proportion of monocytes involved in phagocytosis. The production of nitric oxide was evaluated through the Griess reaction, while de hydrogen peroxide production through the red phenol oxidation in presence of peroxidase. Lipid body formation was evaluated by oil red O staining. The drug concentrations used *in vitro* were obtained by the higher serum levels observed *in vivo* after ingestion of the drugs, which was 360 ng/mL for arthemeter 4,9 µg/mL for lumefantrine and 687ng/mL for mefloquine. When monocytes and erythrocytes were treated with arthemeter, it was observed a decrease in the phagocytic index when analyzed through opsonin receptors (7,5x5,2) (p=0,02). The reduction in phagocytosis was similar when quantified by hemozoin ingestion (p=0,02). Regarding the lumefantrine treatment, a reduction from 8,4 to 4,6 was observed in the phagocytic index when only monocytes were treated and phagocytosis was assessed through pathogen-associated molecular pattern receptors. An additional reduction was also observed in phagocytic index for esquizonts, through PAMP_r when only monocytes were treated (p=0,006). When monocytes were stimulated with parasitized erythrocytes by PAMP_r, all three drugs diminished the lipid body formation. However, when monocytes were stimulated with sensitized infected erythrocytes by the opsonin receptors, an increase in lipid body formation was observed when lumefantrine or mefloquine treatment were done (p>0,05). When monocytes were stimulated with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes there was an increase in hydrogen peroxide production (p=0,009), whereas mefloquine treatment reduced the basal production of H₂O₂ by monocytes (p<0,05). Reduction observed in lipid body production after monocyte stimulation with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by PAMP_r and its increase when monocyte

stimulation occurred by opsonin receptors show that lipid body formation depended on the intracellular pathway by which monocytes were stimulated. Lumefantrine reduced phagocytosis of infected erythrocytes through PAMPs, while reduction caused by artemether was observed when phagocytosis occurred by complement receptors. Our data show that artemether, lumefantrine and mefloquine modulate monocyte functions in defense against *P. falciparum*. Therefore, we conclude that beside the antiparasitic action of these drugs they also modulate the innate defense against parasite.

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença referida em documentos desde tempos antigos, sendo que as primeiras referências à doença são datadas século VI aC. É a doença infecciosa que mais influenciou a história da humanidade. Ainda hoje continua sendo um dos principais problemas de saúde pública mundial, acometendo milhões de pessoas, principalmente nas regiões tropicais, e resultando em aproximadamente em 600 mil mortes por ano, sendo que 3,3 bilhões de pessoas por ano em 97 países e territórios estão sob o risco de contrair malária. De acordo com as últimas estimativas, 198 milhões de casos de malária ocorreram globalmente em 2013, que levou a 584.000 mortes. Na África, estima-se que 90% de todas as mortes por malária ocorrem em crianças com menos de 5 anos (WHO, 2014).

Tanto a distribuição geográfica da endemia causada pelo *P. vivax* quanto a do *P. falciparum* são muito abrangentes, com predominância de algumas espécies em alguns locais, como a península coreana, onde ocorre apenas malária vivax, e em grande parte da África sub-saariana, onde a maioria da população é negativa para o antígeno Duffy dos eritrócitos e isso parece que limita a malária pelo *P. vivax* nessa região, predominando a infecção pelo *P. falciparum*. Na América Latina, incluindo o Brasil, mais de 80% das infecções são devidas ao *P. vivax* e em algumas regiões da Índia e China, também ocorre o predomínio do *P. vivax* (Mueller e cols., 2009).

Na América Latina, a Amazônia brasileira ainda registra o maior número de casos de malária. Houve um grande aumento no número de casos de malária nas décadas de 70 e 80, quando houve uma expansão no processo de ocupação da Amazônia, facilitado pelo incentivo do governo para promover o desenvolvimento econômico da região. O que ocasionou um intenso e desordenado crescimento demográfico e modificações drásticas no meio ambiente, desmatamento, construção de hidrelétricas, mineração e desenvolvimento agrário (Brasil, 2000). Desde o ano 2000 o número de casos de malária tem diminuído na região Amazônica, com uma redução de mais de 50% dos casos entre 2005 e 2014. Em 2005 foram notificados 606.069 casos de malária no Brasil, em 2012 foram notificados 241.418 casos e em 2014 o número passou para 143.066 casos da doença na Região Amazônica, que engloba os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Lapouble, 2014; MS, 2014). Três espécies de plasmódio são responsáveis pelos casos de malária humana no Brasil: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (SVS, 2014), sendo que predominam as infecções causadas pelo *P. vivax*.

Na Região Amazônica, no período de 2000 a 2011, as infecções pelo *P. vivax* representavam 78,7%, passando em 2014 para 83% dos casos notificados. As infecções pelo *P. falciparum*, que em 2006 representavam mais de 20,0% dos casos notificados na região, caíram para menos de 15,5%

em 2014. Atribui-se essa redução expressiva da infecção pelo *P. falciparum* à mudança, a partir de 2006, no tratamento de primeira escolha da malária por essa espécie, passando do esquema terapêutico que utilizava a quinina e doxiciclina para combinações utilizando os derivados da artemisinina (SVS, 2013; Oliveira-Ferreira e cols., 2010).

Na região extra-amazônica, mais de 80% dos casos registrados no Brasil são importados de área endêmica do continente africano (SVS, 2014). As principais medidas de controle da doença são baseadas na proteção individual contra a picada do mosquito vetor com o uso de repelentes e mosquiteiros impregnados de inseticida, o rápido diagnóstico específico e o tratamento precoce com antimaláricos, e através de atividades de saneamento ambiental para controle do vetor (SVS, 2014). No Brasil, as condições climáticas são propícias para a sobrevivência do vetor e as condições socioeconômicas e ambientais favorecem a transmissão da doença.

1.1. Parasitos e ciclo biológico

A malária humana pode ser causada por cinco espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (Lee e cols., 2011), sendo que no Brasil, apenas três dessas espécies estão associadas à malária em seres humanos: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. 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* tem ocorrência apenas no Sudeste Asiático (Brasil 2009, MS 2014).

Denominado esquizogônico, o ciclo assexuado do plasmódio, inicia-se após a picada da fêmea do anofelino, com a inoculação no homem de esporozoítos infectantes. Em seguida os esporozoítos migram rapidamente pelas camadas da pele e entram na corrente sanguínea, por onde alcançarão o fígado pelo espaço porta. No caso de indivíduos imunes, a imunidade adquirida reduz a velocidade de migração e a taxa de infectividade. No fígado, os esporozoítos têm apenas poucos segundos para deixar os sinusóides hepáticos em direção aos hepatócitos, dando início ao ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia tecidual, que leva seis dias para a espécie *P. falciparum*, oito dias para a *P. vivax* e 12 a 15 dias para a *P. malariae*. Durante esta fase, o *P. vivax* e o *P. ovale* apresentam desenvolvimento lento de alguns dos seus esporozoítos, formando os hipnozoítos, formas dormentes do parasito responsáveis pelas recaídas da doença meses ou anos após (CDC, 2015,

Brasil, 2010). Ao final do ciclo tecidual, os esquizontes rompem o hepatócito, liberando milhares de merozoítos na corrente sanguínea. Cada hepatócito rompido libera cerca de 2.000 merozoítos quando a infecção é pelo *P. malariae*; 10.000, pelo *P. vivax* e 40.000, pelo *P. falciparum*.

Os merozoítos irão invadir os eritrócitos, dando início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios: o ciclo sanguíneo ou eritrocítico. Essa interação dos merozoítos com os eritrócitos envolve reconhecimento de receptores específicos. A entrada dos merozoítos nos eritrócitos tem que ser rápida e eficiente porque os antígenos de superfície da forma extracelular do parasita são particularmente vulneráveis ao ataque do sistema imunológico (Cowman e Crab, 2006). O *P. malariae* só invade eritrócitos velhos (0,1% do total), o *P. vivax* invade preferencialmente os eritrócitos jovens e o *P. falciparum*, eritrócitos em qualquer fase evolutiva. Durante um período que varia de 48 a 72 horas, o parasito se desenvolve no interior do eritrócito até provocar a sua ruptura, liberando novos merozoítos que irão invadir novos eritrócitos.

A ruptura e a conseqüente liberação de parasitos e seus metabólitos na corrente sanguínea estimulam a produção de fator de necrose tumoral e de outras citocinas que traduz-se clinicamente pelo início do paroxismo malárico, que se repetirá com o término do novo ciclo, em dois dias, quando a infecção for devida ao *P. falciparum* ou *P. vivax* e em três dias, quando devida ao *P. malariae*. Inicialmente, no ciclo sanguíneo, dentro do eritrócito, o parasito sofre uma série de transformações morfológicas, sem divisão celular, até chegar na fase de esquizonte, quando se divide e origina novos merozoítos, que serão lançados na corrente sanguínea, após a ruptura do eritrócito (CDC 2015, Brasil, 2010).

Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos, que amadurecem sem divisão celular e tornam-se infectantes para os mosquitos. Os gametócitos são o estágio sexuado dos parasitos da malária que se desenvolvem no eritrócito e são transmitidos através da picada do mosquito vetor no momento do repasto sanguíneo. O nível de transmissão é determinado pela frequência com que o mosquito anofelino se alimenta no hospedeiro humano durante o período em que o indivíduo está apresentando densidade suficiente dos estágios sexuados do parasito no sangue periférico (Bousema e cols., 2011; Lapouble, 2014).

O ciclo esporogônico, reprodução sexuada, do plasmódio ocorre no estômago do mosquito, após a diferenciação dos gametócitos em gametas masculino e feminino, e a sua fusão, com formação do ovo (zigoto). Este se transforma em oocineto, forma móvel, que migra até a parede do intestino médio do *Anopheles*, formando o oocisto, no interior do qual se desenvolverão

os esporozoítos. O ciclo esporogônico nos *Anopheles* varia com a espécie de plasmódio e com a temperatura ambiente, levando em torno de 10 a 12 dias. Os esporozoítos produzidos nos oocistos são liberados na hemolinfa do inseto e migram até as glândulas salivares, de onde são transferidos para o sangue do hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo (Brasil, 2010).

1.2. Mecanismos de defesa contra o plasmódio

O sistema imunitário utiliza de diversos mecanismos para impedir ou limitar o crescimento do plasmódio no organismo humano. As formas extracelulares do parasito, esporozoítos e merozoítos, antes de infectarem as células alvos podem sofrer fagocitose pelos macrófagos, no local da picada, ou ao atravessarem o baço e o fígado (Tosta e col., 1982). Mecanismos imunológicos inatos representam a primeira linha de defesa contra patógenos invasores (Theander, 1991). Para infecções pelo plasmódio, a capacidade de montar uma resposta inata eficaz pode significar a diferença entre a vida e a morte (Walther e col., 2006). O plasmódio utiliza receptores de membrana para penetrar na célula do hospedeiro. A ausência desses receptores constitui um fator de resistência (Miller e col., 1973). Indivíduos da raça negra, cujos eritrócitos não possuem antígenos Fy, são geneticamente resistente ao plasmódio vivax, pois os merozoítos do *P. vivax* utilizam uma molécula associada ao antígeno Fy do grupo sanguíneo Duffy como receptor para penetrar em eritrócitos (Miller e col., 1973). O principal nutriente do plasmódio na fase eritrocitária é a hemoglobina (HbA). A hemoglobina fetal (Billig e col., 2012) e as patológicas HbS, HbC (Friedman, 1978; LaMonte e col., 2012) funcionam como fatores de resistência por restringirem o crescimento do plasmódio no interior de eritrócitos.

Os antígenos do plasmódio que são liberados logo após a ruptura dos eritrócitos ao final de cada esquizogonia causam intensa ativação do sistema imunitário, com liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, ativando monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células citotóxicas naturais, que reagem contra o parasito limitando ou impedindo seu crescimento (Plebanski e Hill, 2000; Tabanez, 2006).

1.3. Papel da imunidade inata na defesa contra o plasmódio

Os indivíduos de área não endêmica que nunca tiveram contato com o plasmódio antes, geralmente ficam doentes em sua primeira exposição ao parasita. No entanto em áreas endêmicas de malária, a exposição contínua ao parasito leva o indivíduo a desenvolver uma proteção parcial contra a

malária, o indivíduo passa a ter quadros de infecção mais branda e não desenvolve malária grave (Gupta e cols.,1999).

A imunidade antimalárica necessita de anos de contato com o plasmódio e para manter essa imunidade, necessita estímulo antigênico contínuo (Walker e Brodie, 1982 ; Tosta, 1987). Esta proteção não é total, no sentido de impedir o desenvolvimento do parasito, sendo somente capaz de controlar e reduzir os sintomas da infecção (Tosta, 1987). Quando um indivíduo é picado pelo mosquito infectado, os esporozoítos movem-se rapidamente a partir da derme para o fígado, e nos hepatócitos durante a replicação os esporozoítos estimulam a expressão de genes de IFN do tipo I dentro do vacúolo parasitóforo (Miller, e cols., 2014).

Possivelmente a detecção do RNA do parasito pelos hepatócitos induza produção do IFN do tipo I, que medeia o recrutamento de células citotóxicas naturais (Natural Killer-NK) e células NKT, que produzem IFN- γ , desencadeando uma cascata de proteínas que estão envolvidas no controle da replicação do parasita (Miller e cols., 2014), e estimulam a produção de óxido nítrico e outros componentes tóxicos que interferem com a multiplicação do parasita no fígado (Tosta e Muniz-Junqueira, 2011; Miller e cols., 2014). Um único esporozoíto é capaz de gerar milhares de merozoítos e o controle do parasita pelo IFN do tipo I não é suficiente para controlar essa intensa multiplicação (Miller e cols., 2014). No entanto, estudos longitudinais em populações expostas sugerem que as respostas imunes às fases pré-eritrocitárias provavelmente têm envolvimento limitado (Owusu-Agyei e cols., 2001).

Dos hepatócitos, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea onde iniciam o ciclo eritrocítico e causam a sintomatologia da malária (Gazzinelli e cols., 2014). No ciclo eritrocítico, os receptores semelhante ao toll (TLR), a via do NF- κ B, que induz citocinas pro-inflamatórias, e o IFN são regulados positivamente (Franklin e cols., 2009; Sharma e cols., 2011). Normalmente, a infecção aguda é controlada e a infecção crônica é estabelecida com baixa densidade parasitária, com episódios intermitentes de febre associados com picos de maior parasitemia. Tais picos são de menor densidade progressivamente até que a infecção é eliminada, geralmente depois de muitos meses (Miller e cols., 2000). A resistência à infecção também é mediada pelo IFN- γ , que exerce um papel crucial na indução de células imunes inatas, promovendo respostas pró-inflamatórias, e ativando as funções efetoras de macrófagos (Artavanis-Tsakonas e Riley, 2002; Walther e cols, 2006; Sponaas, e cols., 2009; Antonelli e cols., 2014).

No fígado, antígenos do parasito são processados e apresentados pelo CPH de classe I, induzindo resposta citolítica pelos linfócitos TCD8+, que vão eliminar as células infectadas. No baço, concentra-se grande quantidade de

eritrócitos parasitados e muitos linfócitos T e B, células apresentadoras de antígenos, macrófagos e células dendríticas. Em consequência dessa intensa ativação e da fagocitose de plasmódio e seus produtos, os macrófagos elaboram enzimas, radicais de oxigênio, e nitrogênio que são tóxicos para o parasito (Theander, 1991).

Os monócitos e neutrófilos são considerados as células efetoras mais importantes na malária (Theander, 1991). O sistema do complemento é um importante mecanismo efetor da imunidade inata, o C3b, C4b e o iC3b são opsoninas, ou seja, recobrem a superfície de microrganismos para que os mesmos sejam mais facilmente fagocitados. A fagocitose ocorre quando há interação do fragmento opsonizante com seu respectivo receptor nos monócitos e neutrófilos. Desse modo, C3b e C4b ligam-se ao receptor CR1, enquanto iC3b liga-se a CR3 e CR4 (Abbas e cols., 2011). A infecção é controlada por mecanismos dependentes e independentes de fagocitose, macrófagos ativados pelo INF- γ secretam interleucina (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral, fator transformador de crescimento beta, fator estimulador de colônia e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são fatores solúveis tóxicos ao parasita (Clark e Cowden, 2003). Os linfócitos ativados passam a produzir grande quantidade de anticorpos que ocupam os sítios de ligação nas células do hospedeiro impedindo a entrada do parasito nos hepatócitos e eritrócitos, como também facilitam a fagocitose. A ação dos anticorpos opsonizantes aumenta a adesão dos eritrócitos infectados pelo plasmódio aos monócitos, potencializando a fagocitose (Theander, 1991; Muniz-Junqueira e Tosta, 2009).

A ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida tem a participação central das células dendríticas. Células dendríticas são ativadas pelo ADN do parasito, via TLR9 e sensores citosólicos e produzem citocinas que medeiam a resistência do hospedeiro à infecção (Ing e cols., 2006; Franklin e cols., 2007; Torgler e cols., 2008; Gowda e cols., 2012).

Em camundongos foi demonstrado que a sinalização por meio da proteína MyD88 (proteína do gene da resposta primária mielóide 88), a produção de IL-12 pelas células dendríticas e a liberação de IFN- γ pelas células NK formam um mecanismo de resistência à infecção pelo plasmódio (Ing e cols., 2006; Wykes e cols., 2007; Torgler e cols., 2008; Gowda e cols., 2012).

Diversos fatores são determinantes da imunidade e imunopatogeniana na infecção malárica, como a resposta imunitária individual, idade, número de infecções, infecções mistas, gestação, características genéticas do hospedeiro e da cepa do plasmódio, grau de transmissão local da malária, entre outros (Miller e cols, 2002). A aquisição de imunidade à infecção pelo

plasmódio é relativamente lenta para desenvolver e incompleta, embora a imunidade à morte pela doença é adquirida mais rapidamente e pode ser importante após um único episódio (Gupta e cols., 1999).

1.4. Drogas antiparasitárias

Os fármacos antimaláricos são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40 (França e cols., 2008; Duarte, 2012). São específicos para cada etapa do ciclo de vida do plasmódio. Antimaláricos têm diferentes efeitos sobre as diferentes fases do ciclo de vida do parasita e podem ser classificados de acordo com a fase e pelo objetivo de seu uso (França et al., 2008; Baird e Surjadaja, 2011).

Esquizotomicidas sanguíneos: agem no estágio eritrocítico do parasita, responsável pela sintomatologia da doença. Podem produzir cura clínica ou supressão da infecção pelas cepas suscetíveis das quatro espécies de plasmódio, mas não produzem cura em relação às formas latentes do *P. vivax* ou *P. ovale* (Duarte, 2012).

Esquizotomicidas teciduais: agem nas formas de esporozoítos e merozoítos do parasita prevenindo a invasão das células sanguíneas ou eliminando o *P. vivax* e *P. ovale* (Duarte, 2012).

Gametocitocidas: destroem as formas sexuadas do parasita para interromper a transmissão do homem para o mosquito vetor, impedindo a disseminação da doença (Duarte, 2012).

O modo de ação dos fármacos antimaláricos define sua classificação em dois grupos: Os alcalóides derivados da cinchona, as aminoquilonas e as acridinas formam o primeiro grupo (França e cols., 2008). Esses fármacos interferem no metabolismo da glicose em diferentes pontos e também na capacidade do parasita de digerir a hemoglobina, impedindo assim, que ele se alimente ou intoxicando-o com altos níveis de ferriprotoporfirina- IX, que é um subproduto tóxico da digestão da hemoglobina (Robert e cols, 2001; Silva e cols., 2005). As pirimidinas e biguanidas formam o segundo grupo, que age interferindo na síntese do ácido tetra-hidrofólico, importante cofator no processo de síntese de ADN e de aminoácidos (Delfino e cols., 2002; França e cols., 2008).

Os derivados de artemisininas sofrem clivagem oxido-redutivos seus peróxidos e também interagem como grupo heme Fe (II) gerando um radical livre que é tóxico para o parasita (Vennerstrom e cols, 2000). Vários estudos mostram que a ponte de endoperóxido dos compostos derivados de artemisinina podem ser clivados pela redução com íon ferroso presente no grupo heme da hemoglobina ou de origem exógena. Esta clivagem forma um ou mais radicais livres que podem alquilar ou modificar covalentemente

proteínas dos parasitas (França, 2008). Outros autores referem que o mecanismo de ação é similar ao das quinolinas, onde os fármacos se acumulam no vacúolo digestivo do parasita e interferem na formação da hemozoína (França, 2008). Quando a artemisinina ou outros trioxanos ativos foram incubadas em concentrações farmacologicamente relevantes com eritrócitos de seres humanos infectados pelo *P. falciparum*, a clivagem catalisada pelo grupo heme da ligação peróxido foi relatada como sendo responsável pela alquilação do heme (Robert e cols.,2001).

A mefloquina é um composto quirál (possui dois centros assimétricos), possui um anel conjugado bi-heterocíclico ativo, e é comercializada na forma racêmica da *eritro- α -(2-piperidil)-2,8-bi (trifluorometil) 4-quinolinametanol* (Duarte, 2012). A digestão da hemoglobina se processa no interior do vacúolo digestivo do parasito. Esta digestão é mediada por uma série de proteases, entre elas as plasmepsinas e falcipainas. Durante o catabolismo da hemoglobina, sua porção protéica (globina) é utilizada como fonte de aminoácidos pelo parasito, e a fração heme, denomina ferriprotoporfirina IX (Fe(II)PPIX), é liberada, sendo um grupo reativo, gerador de radicais livres tóxicos para o parasito (Sullivan, 2002; Aguiar, 2011; Duarte, 2012). O mecanismo de ação da mefloquina, que é um quinolinometanol, envolve a ligação direta ao grupo heme, a inibição de uma ferriprotoporfirina IX polimerase não identificada (inibição de polimerização da heme), a inibição de uma fosfolipase vacuolar e a inibição da síntese de proteína (Duarte, 2012). A interação entre os antimaláricos esquizonticidas sangüíneos com o grupo heme ferriprotoporfirina IX (Fe (III) PPIX) está envolvida na toxicidade destes fármacos ao parasito intra-eritrocítico. Os antimaláricos quinolínicos agem por interferência na cristalização da hemozoína, que tem por unidade básica a β -hematina (Sullivan e cols, 1998; Duarte, 2012). A mefloquina interfere em diferentes passos no processo de nutrição do parasito (Duarte, 2012).

A lumefantrina (LMF), também chamado benflumetol, está estruturalmente relacionado com os antimaláricos aril-amino-álcool hidrofóbicos, incluindo mefloquina, quinina e halofantrina, sugerindo que eles têm modos de ação similares (Eastman e cols., 2009). A lumefantrina é um aril-amino-álcool que impede a estoxificação da hemozoína, de tal modo que a porção tóxica do heme e radicais livres induzem a morte do parasita (Kokwaro e cols., 2007). É um esquizonticida sangüíneo de ação prolongada e lenta que atua nos estágios intra-eritrocíticos assexuados do plasmódio (Djimé e Lefèvre, 2009). A lumefantrina pertence à classe dos quinolinometanóis, inibe a produção de hemozoína, tanto por ligação direta ao grupo heme quanto por inibição da heme polimerase, que é utilizada pelo parasita para catalisar a reação de destoxificação da ferriprotoporfirina IX (Fe

(III) PPIX), formando a hemozoína, que tem por unidade básica aβ-hematina(Valecha e cols., 2009).

GO e Li (2003) realizaram estudo *in vitro* sobre a interação de lumefantrina com os lipídios das membranas celulares e observaram que a presença do fármaco tornava a camada lipídica mais compacta e condensada (Pinheiro e cols, 2012). Tendo em vista que durante a infecção malárica a membrana do eritrócito fica mais fluida, a característica química da lumefantrina (anel fluoreno ligado por uma ligação dupla a um grupo fenil) permitiria a condensação dos lipídios nos eritrócitos, alterando sua permeabilidade (GO e Li,2003; Pinheiro e cols, 2012). O tratamento de primeira escolha para a infecção por *P. Falciparum* recomendado pelo ministério da Saúde brasileiro é combinação fixa de artemeter com lumefantrina e ou a combinação de artesunato com mefloquina por 3 dias (MS, 2010).

1.5. Ação imunomoduladora dos antimaláricos

Todos os fármacos antimaláricos indiretamente influenciam a resposta imunitária por meio da sua capacidade para destruir os parasitas da malária e, portanto, reduzir a quantidade de antígenos capazes de ativar o sistema imunitário (Muniz-Junqueira, 2007). Além deste efeito, algumas drogas antiplasmodiais também exercem um efeito direto sobre o sistema imunitário (Muniz-Junqueira, 2007).

Artemisininas e todos os derivados relacionados estão sendo considerados uma importante classe de antimaláricos à base de Qinghaosu altamente eficazes contra a malária multirresistente, especialmente por *Plasmodium falciparum* (Hommel, 2008). No entanto, eles podem interromper proteínas de transporte do parasita, interromper a função mitocondrial e inibir a angiogênese (Anfosso e cols, 2006; Golenser e cols, 2006).

Foi demonstrado por Wang e cols. (2009) que o artemeter inibiu a ativação e proliferação de células T tanto *in vitro* como *in vivo*. O mecanismo imunossupressor do artemeter está correlacionado com a inibição da Ras-RAF1-ERK1/2 em cascata de ativação de células T. Artemisininas também podem interferir com as competências funcionais de neutrófilos. Em uma investigação para determinar os efeitos da artemisinina e seus derivados sobre as função dos granulócitos, a artemisinina, diidroartemisinina e artesunato, nas concentrações de 0,1, 0,5, 5 e 50 mg/L, diminuiu a capacidade fagocitária dos neutrófilos quando incubados com *Escherichia coli*; contudo, houve aumento da produção de espécies de oxigênio reativo (Wenische cols.,1997).

Artemisininas podem diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias derivadas de macrófagos, particularmente de fator de necrose tumoral. Elas interrompem as vias de transcrição em monócitos/macrófagos e poderiam, portanto, ser esperado modular as funções dos monócitos/macrófagos do hospedeiro. Especialmente importante é sua modulação da via do NF- κ B, uma via de transcrição envolvida na expressão de genes relacionados com a produção de citocinas, inflamação, moléculas de adesão e a apoptose (Pahl, 1999).

A artemisinina e o artemeter também parecem regular as respostas funcionais de monócitos/macrófagos ao nível celular, e inibe a fagocitose de monócitos (Muniz-Junqueira, 2007). Em geral, parece que artemisininas podem assumir um potencial terapêutico imunossupressor em reações imunitárias inflamatórias persistentes em macrófagos por causa da sua capacidade para inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Perlmann e Troye-Blomberg, 2002).

A mefloquina, assim como o artemeter e a quinina, regula negativamente a expressão de receptores em monócitos 40% ou mais, nas concentrações terapêuticas utilizadas de cada droga. A mefloquina reduz a expressão de IL-1, IL-6 e FNT (Goldring e Nemaorani, 1999). A mefloquina pode melhorar a evolução da doença, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (Landewe e cols, 1995), que estão envolvidas nos passos iniciais da patogênese do paludismo grave (Muniz-Junqueira, 2007). Além disso, a mefloquina pode diminuir a adesão de eritrócitos parasitados, provavelmente pela regulação negativa da expressão de receptores de adesão (Udomsangpetch e cols., 1996; Goldring e cols., 1999). Por um lado, a cloroquina, quinina, mefloquina, amodiaquina, artemeter (Shalmiev e cols., 1996) e a artemisinina (Wenisch e cols., 1997) podem diminuir a defesa contra o parasita pela inibição da fagocitose dos parasitos da malária por monócitos ou neutrófilos. A compreensão dos vários aspectos das respostas imunitárias do hospedeiro ao plasmódio é essencial para a compreensão da interferência de fármacos anti-maláricos existentes com a imunidade anti-malárica do hospedeiro (Perlmann e Troye-Blomberg, 2002).

JUSTIFICATIVA

Além de seu papel antiparasitário, várias drogas antimaláricas modulam as funções do sistema imunitário, podendo contribuir para aumentar ou dificultar a defesa antiparasitária.

As funções do sistema de fagócitos são fundamentais para defesa contra o plasmódio, tanto nas fases iniciais de uma infecção no indivíduo não imune, como também como efetores da imunidade adquirida. Portanto, é necessária uma melhor compreensão da influência das drogas antimaláricas mais frequentemente utilizadas, como o artemeter, a lumefantrina e a mefloquina sobre o sistema imunitário envolvido na defesa contra o plasmódio, ocasionando um melhor entendimento nos fatores que favorecem ou dificultam a ação do sistema imunitário na defesa antiparasitária.

A compreensão da influência da terapêutica utilizada para o tratamento da doença sobre as funções dos fagócitos poderá contribuir para utilização de um arsenal terapêutico mais adequado.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência imunomoduladora das drogas antiparasitárias artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre mecanismos do sistema imunitário inato que atuam contra as formas eritrocitárias do plasmódio.

2.2. Objetivos específicos:

Avaliar a influência do artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a capacidade fagocitária, produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio e expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos de indivíduos saudáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Neste trabalho foi avaliada a influência *in vitro* dos antimaláricos artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre capacidade funcional dos fagócitos de indivíduos saudáveis.

As influências destes fármacos sobre os fagócitos foram investigadas por meio da avaliação da capacidade fagocitária de monócitos mediada por receptores para padrões moleculares de patógenos e para receptores de opsoninas, sobre o metabolismo oxidativo pela determinação da produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e pela produção de corpúsculos lipídicos pela técnica do Oil Red. O diagrama geral do estudo encontra-se descrito na figura 1.

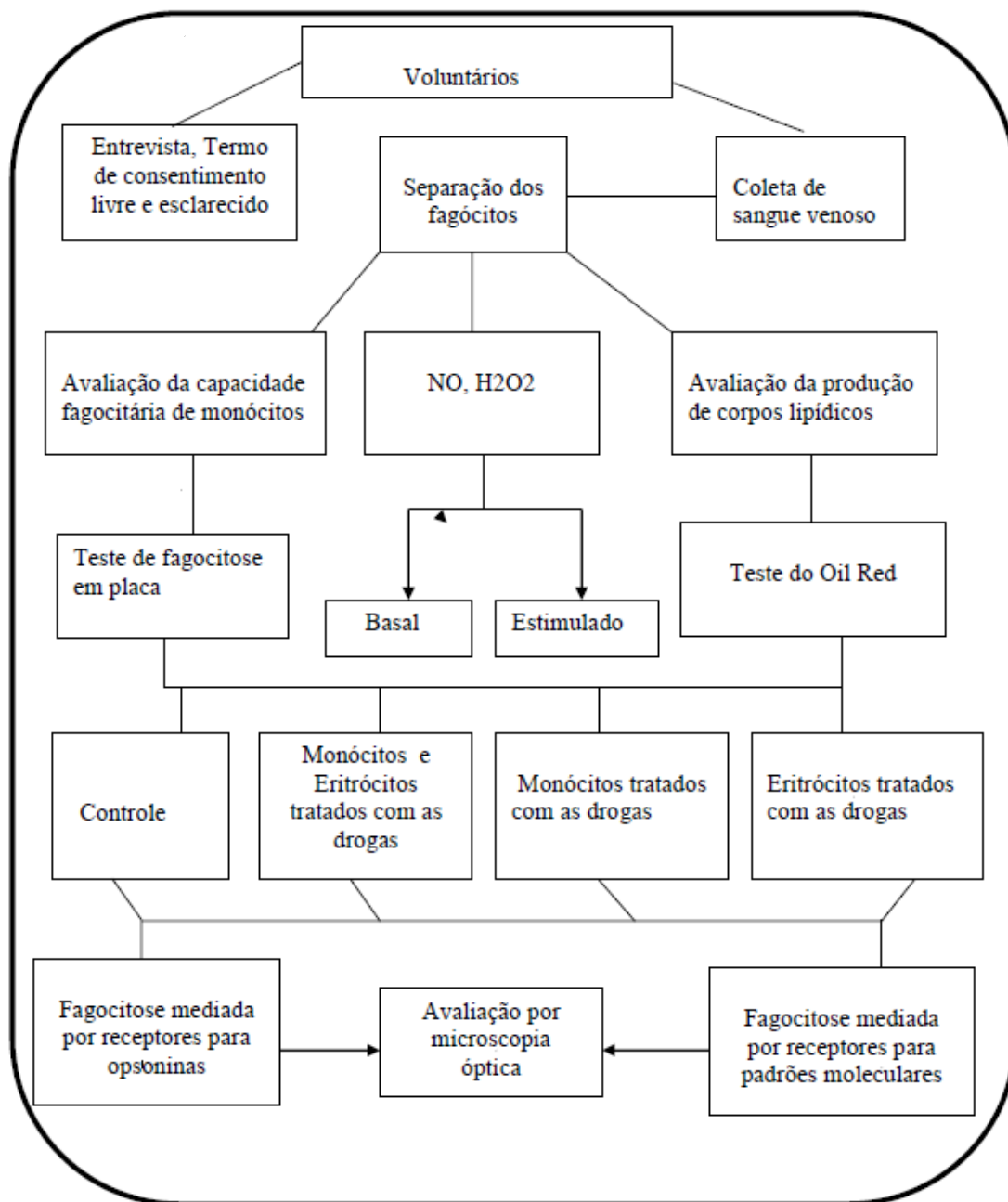


Figura 1 Delineamento experimental

3.2. Grupos de estudo e aspectos éticos

Este estudo foi realizado no laboratório de Imunologia Celular da Área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Durante todo o desenvolvimento do trabalho, as normas éticas para pesquisa científica em seres humanos estabelecidas pela Declaração Helsinki atualizada (WMA, 2013) e pelo Ministério da Saúde Brasileiro, resolução 196/96 (CNS, 1996) foram rigorosamente observadas.

O projeto de pesquisa, enquadrado dentro do grupo de risco mínimo, foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, parecer número 365.997. (Anexo 1).

Foram selecionados para participar desta pesquisa 15 indivíduos saudáveis para avaliação da fagocitose, com média de idade de 32,47 anos (Tabela 1) e 20 indivíduos saudáveis para avaliação da produção do NO e H₂O₂, com média de idade de 34,71 anos (Tabela 2), variando entre 21 e 53 anos.

Foram critérios de exclusão do estudo indivíduos idosos, que estivessem utilizando medicamentos ou com doenças pré-existentes, como doenças reumáticas, doenças alérgicas, câncer, doenças infecciosas, doenças endócrinas, como *Diabetes mellitus*, obesidade, tabagismo e alcoolismo. Foram excluídos indivíduos que tivessem algum fator identificado pela história clínica que pudesse influenciar o sistema imunitário.

A coleta do sangue só foi feita após os voluntários estarem cientes dos objetivos da pesquisa e dos procedimentos a serem realizados e após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido. (Anexo 1).

Cada voluntário doou 20 ml de sangue que foi coletado com vacutainer heparinizado, com agulha de coleta múltipla, da região da fossa cubital, com material estéril e descartável, após anti-sepsia com álcool iodado. A amostra foi utilizada para análise das funções dos fagócitos *in vitro* tratados ou não com artemeter, lumefantrina ou mefloquina.

Este trabalho foi elaborado e desenvolvido com total isenção de quaisquer conflitos de interesse. As drogas utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Programa Nacional de Malária do Ministério da Saúde Brasileiro.

Dos indivíduos do grupo controle em que foram estudadas a função fagocitária, quanto ao gênero, 80% eram do sexo masculino e 20% do sexo feminino. A média de idade foi de $32,47 \pm 8,831$, variando de 21 a 47; a média do peso foi de $73,80 \pm 8,360$, variando de 61 a 89; a média da altura foi de $1,699 \pm 0,06468$, variando de 1,60 a 1,80 e a média do índice de massa corporal (IMC) foi de 25,65

Os parâmetros antropométricos para os indivíduos em que foi avaliada a produção dos radicais livres quanto ao gênero foram de 72,3% eram do sexo masculino e 27,7% do sexo feminino. A média de idade foi de $34,56 \pm 9,139$, variando de 21 a 53 ; a média do peso foi de $73,88 \pm 11,63$ variando de 46 a 103; a média da altura foi de $1,696 \pm 0,08461$, variando de 1,530 a 1,85 e a média do índice de massa corporal (IMC) foi de 25,74.

3.3. Cepa do *Plasmodium falciparum*

Foi utilizada a cepa do *Plasmodium falciparum* NF-54, gentilmente cedida pelo Professor Doutor Gerhard Wunderlich, do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo, e mantida em nitrogênio líquido

Para realização dos experimentos o *P. falciparum* foi mantido em cultura contínua, segundo a técnica Trager and Jansen modificada (Trager e Jansen, 1976; Muniz-Junqueira e cols, 2001), em eritrócitos O⁺, para hematócrito de 4%, suspensos em RPMI 1640 tamponado com 20 mM/L HEPES e 7.5% NaHCO₃ (26.7 mL/L) e suplementado com 0.25 mg/dL hipoxantina em pool de soro humano 10%, inativado pelo calor, em 5% CO₂ em ar, a 37°C.

3.3.1. Preparo dos eritrócitos parasitados para utilização nos testes de fagocitose e expressão de corpúsculos lipídicos

Para cada experimento, uma alíquota de 20 µl era retirada da suspensão eritrócitos infectados e quantificados em câmara de Neubauer. A parasitemia era determinada em um distendido do sangue e o número de eritrócitos infectados era quantificado em 1000 eritrócitos. Foi determinada a porcentagem de formas em anel e esquizonte. Foram utilizados nos experimentos quando a parasitemia estava acima de 9% e com predomínio de formas maduras na cultura.

3.4. Concentrações dos antimaláricos utilizadas nos experimentos *in vitro*.

Os fagócitos e/ou os eritrócitos parasitados com *Plasmódium falciparum* foram pré-tratados com 360 ng/mL de artemeter por 60 minutos, que representa o pico máximo obtido em seres humanos após injeção da droga. Foi utilizada a apresentação do Artemeter (Injeção de Artemeter Ph. Int. 80 mg/ mL fabricante Ipca, Mumbai, India) injetável da ampola 80mg/mL. A escolha desta concentração baseou-se em estudo farmacocinético da droga efetuado em seres humanos, no qual se determinou que após a ingestão de 200 mg de artemeter ocorre em média um pico sérico de 360ng/mL, esta concentração foi alcançada em $1,88 \pm 0,21$ hr (Ali e cols., 2010).

Com relação à lumefantrina (Lumarten, fabricante Cipla, Índia), os fagócitos e/ou eritrócitos parasitados com *Plasmódium falciparum* foram pré-incubados com 4,9 µg/mL deste medicamento por 60 minutos. Esta concentração foi escolhida, pois corresponde ao pico sérico observado após a ingestão de 480mg da droga (WHO, 2012). Entretanto, nesses experimentos, os fagócitos e/ou os eritrócitos parasitados com *Plasmodium falciparum* foram também pré-tratados com 125ng/ml de Artemeter por 60 minutos, pelo fato de que o medicamento disponível para os experimentos era uma associação de Artemeter/Lumefantrina, fornecida pelo Ministério da Saúde, e as concentrações utilizadas foram ajustadas em função dos parâmetros farmacocinéticos da Lumefantrina.

Para a mefloquina (Artesunato + Mefloquina 25+55mg, fabricante Farmanguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), os fagócitos e/ou os eritrócitos parasitados com *Plasmodium falciparum* foram pré-incubados com 687ng/ml do medicamento por 60 minutos, que é a concentração que corresponde ao pico sérico médio observado após 6 horas e que permanece até 24 horas após a ingestão de 300 mg deste fármaco (M.S.: 1.1063.0124, 2010). Porém, nesses experimentos, os fagócitos e/ou os eritrócitos parasitados com *Plasmodium falciparum* foram também pré-tratados com 25mg/ml de artesunato por 60 minutos, pelo fato de que o medicamento disponível para os experimentos era uma associação de Artesunato/Mefloquina, fornecida pelo Ministério da Saúde, e as concentrações utilizadas foram ajustadas em função dos parâmetros farmacocinéticos da Mefloquina.

3.5. Separação dos monócitos por aderência para o teste de fagocitose em placa

Coletou-se 20mL de sangue venoso de 15 voluntários humanos saudáveis em tubo vacutainer estéril heparinizado. O sangue era centrifugado a 400g por 10 min para obtenção do soro para sensibilização dos eritrócitos parasitados. O restante do sangue era ressuspense em salina tamponada com fosfato (STF) ao volume inicial e centrifugado em Percoll (Sigma, cidade da Sigma, USA) densidade 1,077, na proporção de 3 mL de Percoll para cada 5 mL de sangue, a 750 g por 15 min a 4°C, para a separação das células mononucleares (CMN). As CMN recuperadas eram ressuspensas em 10 mL de STF gelada e centrifugada a 400g por 10 min, a 4°C, para retirar o Percoll. O sobrenadante era desprezado e novamente ressuspense em 10 mL de STF gelado e centrifugado a 200 g, por 10 min, a 4°C, para retirar as plaquetas. Desprezava-se o sobrenadante e ressuspendia-se as CMN em 2 mL de RPMI1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com bicarbonato (incompleto). As células eram mantidas refrigeradas durante o procedimento.

As CMN eram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada pela exclusão da nigrosina e foi sempre superior 95%. As CMN (10^6) eram distribuídas num volume de 500 μ L por escavação em placas de 24 escavações (TTP, Trasadingen, Switzerland), estéreis, de fundo chato, na qual tinham sido previamente colocadas lamínulas de 13 mm de diâmetro estéreis. As placas eram incubadas em câmara úmida a 37°C, em 5% de CO₂ em ar, por 2 horas, para permitir a aderência dos monócitos à lâmina. Em seguida, as preparações eram lavadas com STF para retirar as células não aderentes. As células separadas foram utilizadas para o teste de avaliação da influência das drogas em estudo sobre a fagocitose e sobre a expressão de corpúsculos lipídicos.

3.6. Avaliação da influência das drogas antimaláricas sobre a fagocitose pelos monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos e pelos receptores para opsoninas.

Utilizando os monócitos aderidos à laminula como acima descrito foi feito o teste de fagocitose em placa. A fagocitose foi testada quando a ingestão dos eritrócitos parasitados ocorreu pelos receptores para opsoninas e quando a fagocitose foi realizada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.

A influência dos antimaláricos sobre a capacidade fagocitária dos monócitos por meio dos receptores para opsoninas, particularmente os componentes do sistema complemento, foi realizado pela sensibilização prévia dos eritrócitos parasitados pelo *Plasmódium falciparum*. A sensibilização foi feita pela incubação prévia por 30 min a 37°C com o soro fresco do próprio doador. Quando os eritrócitos infectados são incubados com o soro fresco, as frações do sistema do complemento presentes no soro adsorvem-se à superfície dos eritrócitos parasitados propiciando a fagocitose pelos monócitos pelos receptores para as frações do complemento. Para avaliação da fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos o soro fresco foi substituído por SFB inativado e as células submetidas ao mesmo procedimento de incubação por 30 min a a 37°C.

Em relação ao tratamento com as drogas antimaláricas, a avaliação da fagocitose pelos receptores para PMP e pelos receptores para opsoninas foi feita por meio de três abordagens diferentes: a) apenas os monócitos foram previamente tratados com os antimaláricos artemeter, lumafantrina e mefloquina. B) somente os eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum* foram previamente tratados com os antimaláricos. C) tanto os monócitos quanto os eritrócitos parasitados foram tratados previamente com os

antimaláricos. Essas abordagens foram feitas com o objetivo de discriminar se as drogas estavam modulando diretamente a função dos monócitos ou se a ação antiparasitária das drogas antimaláricas estavam facilitando a fagocitose dos parasitos pelo fato deles terem sofrido modificações tóxicas devidas a ação das drogas facilitando assim a sua ingestão.

As drogas foram utilizadas nas composições e concentrações acima descritas. Os grupos controles sofreram os mesmos procedimentos, entretanto, as drogas foram substituídas por RPMI, sendo que as células foram incubados por uma hora apenas com RPMI.

Os monócitos aderidos à lamínula como acima descritos foram tratados com as drogas ou com RPMI por 1 hora, e após esse período, distribuiu-se sobre essas células^{10⁶} eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* tratados com as drogas ou com RPMI nas doses acima descritas previamente por 1 h e previamente sensibilizados ou não com o soro do próprio doador.

As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida, em CO₂ a 5% em ar para permitir a fagocitose dos eritrócitos parasitados (adaptado de Muniz-Junqueira e cols., 2001), realizado em duplicata para cada preparação. As preparações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C para retirar as hemácias não aderidas/ingeridas e posteriormente com RPMI contendo 30% de SFB para preservar as preparações, que foram secas com vento quente, fixadas com metanol absoluto (Vetec) por 1 minuto e coradas com Giemsa (Dinâmica) a 10% em tampão para coloração, pH 7,2 por 10 min. As lamínulas foram lavadas com água e montadas em lâminas com resina sintética (Entelan®).

A análise das lâminas foi feita às cegas e a identificação das lâminas foi feita apenas ao final das leituras. As lâminas foram analisadas ao microscópio ótico, com aumento de 1000X em imersão, para determinar o índice fagocitário.

O Índice Fagocitário foi calculado pela multiplicação da proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose pela média de parasitos fagocitados por monócito. Foram contadas 500 células para cada preparação. Foram quantificados separadamente a fagocitose total, de formas em anel, esquizonte e de hemozóina.

3.7. Expressão de corpúsculos lipídicos detectada pela coloração com *Oil Red O* quando os monócitos foram incubados com eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* tratados ou não com os antimaláricos.

Para quantificação dos corpos lipídicos foi utilizada a coloração com óleo vermelho O (*oil red O*), que apresenta grande solubilidade em lipídeos e colore de vermelho os corpúsculos lipídicos presentes no citoplasma dos monócitos.

Os procedimentos de aderência dos monócitos, tratamento com antimaláricos e fagocitose dos eritrócitos parasitados foi realizada conforme acima descrito. Após a fagocitose as preparações foram lavadas e as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, por 30 minutos, e lavadas duas vezes com STF, pH 7,2 e uma vez com álcool isopropílico a 60%. Em seguida, as células foram coradas por 15 minutos com uma solução de óleo vermelho O filtrado 3 vezes em filtro 0,22 μm e preparada no momento do uso a partir de uma solução estoque de 0,5%, sendo 3 partes da solução estoque para 2 partes de água destilada. O excesso de corante foi retirado e as escavações foram lavadas uma vez com 1 mL de álcool isopropílico a 60% e depois duas vezes com 1 mL de água destilada. Os núcleos celulares foram corados com hematoxilina de Mayer por 5 minutos, lavadas novamente com água destilada e as lâminas foram montadas sobre lâminas de vidro em uma fina camada de meio de montagem contendo 10 g de gelatina, 60 mL de água destilada, 70 mL de glicerol e 0,25 g de fenol.

O procedimento de coloração dos corpúsculos lipídicos com óleo vermelho foi realizado em duplicata para cada tratamento e controle e as preparações foram quantificadas em microscópio ótico. Os corpúsculos lipídicos são identificados como estruturas circulares que se coram em vermelho no citoplasma dos monócitos. Para cada lâmina foram contadas 200 células e foram estabelecidas a quantidade média de corpúsculos dentro dos macrófagos (MCL), a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma (MØ%) e o índice corpuscular (IC) que é da MCL multiplicada pelo MØ% (Adaptado de Borges, 2013).

3.8. Influência das drogas antimaláricas, artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a produção *in vitro* de óxido nítrico após incubação dos monócitos com eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum*

A produção do óxido nítrico foi avaliada pela quantificação do nitrito contido nos sobrenadantes das culturas tratadas ou não com os antimaláricos e estimuladas ou não com eritrócito infectado.

Sangue periférico foi coletado e as CMN foram separadas por centrifugação em Percoll a 750 g por 15 minutos a 4°C. As CMN recuperadas eram ressuspensas em 10 mL de STF gelada e centrifugadas a 400g por 10 min, a 4°C, para retirar o Percoll. O sobrenadante era desprezado e as células ressuspensas novamente em 10 mL de STF gelado e, centrifugado a 200 g, por 10 minutos, a 4°C, para retirar as plaquetas. A viabilidade era determinada pela exclusão da nigrosina e foi sempre superior a 95%. As CMN ($1,5 \times 10^5$)

eram incubadas em RPMI1640 (Sigma) contendo 2,67 mL/L de bicarbonato de sódio a 7,5% (pH 7,2), a 37°C, 1 hora para permitir aderência dos monócitos.

As preparações em triplicata eram tratadas ou não com as drogas antimaláricas artemeter, lumefantrina ou mefloquina, nas mesmas concentrações acima referidas e incubadas 1 h, a 37°C, 5% de CO₂. Decorrido o tempo de incubação era acrescentado ou não os eritrócitos parasitados (1×10^7) ou não parasitados e incubadas 30min, a 37°C, 5% de CO₂. Posteriormente, foram feitas mais três lavagens com STF, pH 7,2, a 37°C, seguida pela adição de RPMI suplementado com 10% de SFB e incubado por 24h.

Após 24 h de incubação, 100 µl dos sobrenadantes eram acrescentados ao reagente de Greiss (1-38 N naftiletileno diamina dihidroclorido) a 0,1 %, sulfanilamida a 1% e H₃PO₄ a 25 %] e a reação era lida em espectrofotômetro de placa (Spectramaxplus 384 - Molecular Devices), em 540 nm e os resultados foram expressos como µM NO₂ (Muniz-Junqueira e cols, 2005; Green e cols., 1981).

A curva padrão foi feita pela diluição seriada do nitrito de sódio (NaNO₂) nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, correspondendo respectivamente, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,12 µM e 1,56 µM.

3.9. Influência das drogas antimaláricas, artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a produção *in vitro* de peróxido de hidrogênio após incubação dos monócitos com eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum*

A produção do peróxido de hidrogênio foi avaliada pela técnica da oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase após incubação dos monócitos com eritrócitos infectados ou não com *plasmodium falciparum* e tratados ou não com as drogas antimaláricas.

Sangue periférico foi coletado e as CMN foram separadas por centrifugação em Percoll a 750 g por 15 minutos a 4°C. As CMN recuperadas eram ressuspensas em 10 mL de STF gelada e centrifugadas a 400g por 10 min, a 4°C, para retirar o Percoll. O sobrenadante era desprezado e as células ressuspensas novamente em 10 mL de STF gelado e, centrifugado a 200 g, por 10 minutos, a 4°C, para retirar as plaquetas. A viabilidade era determinada pela exclusão da nigrosina e foi sempre superior a 95%. As CMN ($1,5 \times 10^5$) eram incubadas em RPMI1640 (Sigma) contendo 2,67 mL/L de bicarbonato de sódio a 7,5% (pH 7,2), a 37°C, por 1 h, para permitir aderência dos monócitos.

As preparações em triplicata eram tratadas ou não com as drogas antimaláricas artemeter, lumefantrina ou mefloquina, nas mesmas concentrações acima referidas e incubadas por 1 h, a 37°C, 5% de CO₂. Decorrido esse tempo foi acrescentado ou não eritrócitos parasitados (1×10^7) ou não parasitados incubados por 30 min, a 37°C, 5% de CO₂.

Posteriormente, foram feitas mais três lavagens com STF, pH 7,2, a 37°C, seguida pela adição de 140 µL de tampão fosfato suplementado com dextrose 5,5 mM, vermelho de fenol 0,5 mM e peroxidase tipo II, as placas foram novamente incubadas por 1 h, em ambiente umidificado, com 5% de CO₂, a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, foram adicionados 10 µL de NaOH para interromper a reação catalisada pela peroxidase tipo II. Foi feita a leitura em espectrofotômetro (Spectramax Plus 384, Molecular Devices) em comprimento de onda de 620 nm. Para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio contida em cada poço foi feita, paralelamente, uma curva padrão com peróxido de hidrogênio diluído em tampão fosfato suplementado com 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho de fenol e 19 unidades por mL de peroxidase tipo II nas concentrações de 100 M, 50 M, 25 M, 12,5 M, 6,25 M, 3,12 M, 1,56 M (Pick & Mizel, 1981).

3.10. Análise estatística:

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software Prism® (Graphpad, USA, 2005).

Para a aplicação dos testes estatísticos verificou-se previamente a normalidade ou não das variáveis nas amostras pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a variância da amostra pelo teste de Bartlett. Para comparação entre duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste t pareado e para aquelas que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para amostras independentes foram utilizados o teste t e o teste de Mann-Whitney. Para comparação entre mais do que duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste de ANOVA, para amostras com distribuição não normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

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

Os dados foram expressos graficamente como média e desvio padrão para as amostras com distribuição normal e como mediana, quartis e extremos para aquelas com distribuição não normal.

RESULTADOS

4. Influência dos antimaláricos artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a capacidade fagocitária de monócitos de indivíduos normais quando tratados *in vitro* os eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* e/ou os monócitos de indivíduos normais

A influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos infectados e/ou monócitos de indivíduos normais com os antimaláricos artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a capacidade fagocitária foi investigada pelo teste de fagocitose em placa.

Avaliou-se a fagocitose por meio de dois tipos de receptores: a mediada por receptores para padrões moleculares de patógenos, quando os eritrócitos foram incubados com soro fetal bovino inativado, e a mediada por receptores para opsoninas, quando os eritrócitos foram incubados com soro fresco do doador. A influência sobre a fagocitose foi testada submetendo os monócitos e os eritrócitos infectados à ação das drogas. Como também foram avaliados quando apenas os monócitos ou os eritrócitos foram tratados, para melhor esclarecer em qual célula esses antimaláricos estavam agindo. Para melhor esclarecimento, foram quantificadas individualmente a fagocitose total e a ingestão das formas em anel, esquizonte e a hemozoína.

A capacidade fagocitária foi expressa por meio do índice fagocitário, da média de parasitos/restos de parasitos ingeridos/aderidos por monócitos e do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.1.1. Fagocitose total pelos receptores para padrões moleculares de patógenos

4.1.1.1. Lumefantrina

Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos infectados com *P. falciparum* e/ou de monócitos de indivíduos normais com lumefantrina sobre a fagocitose por receptores para padrões moleculares para patógenos

Quando tratamos apenas os monócitos com o lumefantrina, houve diminuição da mediana do índice fagocitário de 8,4 para 5,8 ($p = 0,023$, teste t) e a mediana da proporção de monócitos de 7,4 para 5,8 ($p = 0,025$, teste t) e não houve alteração na média de parasitos fagocitados (Figura 2 B,E,H). Porém, quando tratamos apenas os eritrócitos infectados e não sensibilizados, houve uma tendência não significativa para aumentar as medianas do índice fagocitário de 8,4 para 11, e da mediana de proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de 7,4 para 10,2, não havendo diferença

na média de parasitos fagocitados ($p>0,05$). Essas ações opostas sobre as duas células possivelmente foram responsáveis por não observarmos alteração na fagocitose quando ambas as células foram tratadas com a droga (Figura 2 A,D,G).

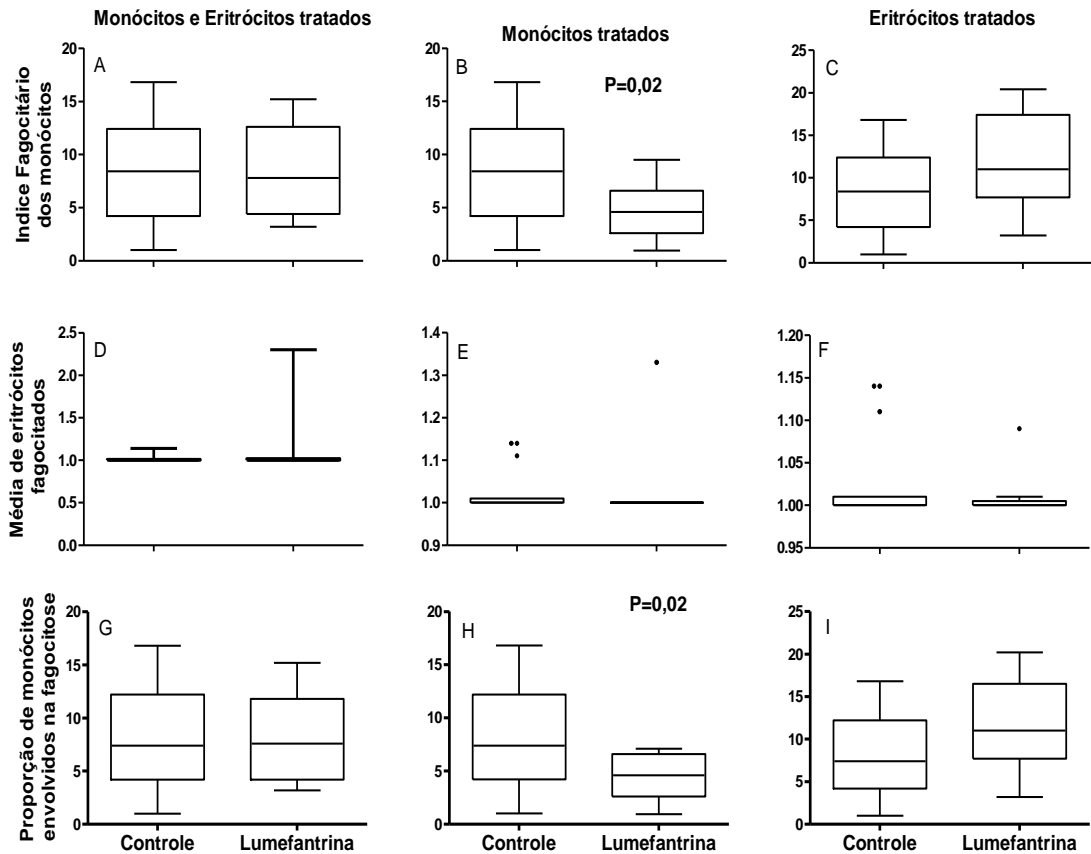


Figura 2. Influência do tratamento com lumefantrina sobre a fagocitose por monócitos. Os monócitos, os eritrócitos ou ambos foram tratados *in vitro* por 60 min. Foram utilizados 10^6 eritrócitos infectados com *P.falciparum* não sensibilizados por escavação. A,B,C - Índice fagocitário; D,E,F- Média de parasitos/restos de parasitos ingeridos/aderidos por monócito; G,H,I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em B : Diminuição do índice fagocitário ($p=0,02$). Em H: Diminuição do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,02$).

4.1.1.2. Artemeter

Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos infectados com *P. falciparum* e/ou de monócitos de indivíduos normais com artemeter sobre a fagocitose por receptores para padrões moleculares para patógenos

Não houve influência do artemeter quando incubado por 60 min com os eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados e/ou os monócitos de indivíduos normais, sobre a mediana do índice fagocitário, e a mediana da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose e o número de parasitos fagocitados por monócito. (Figura 3).

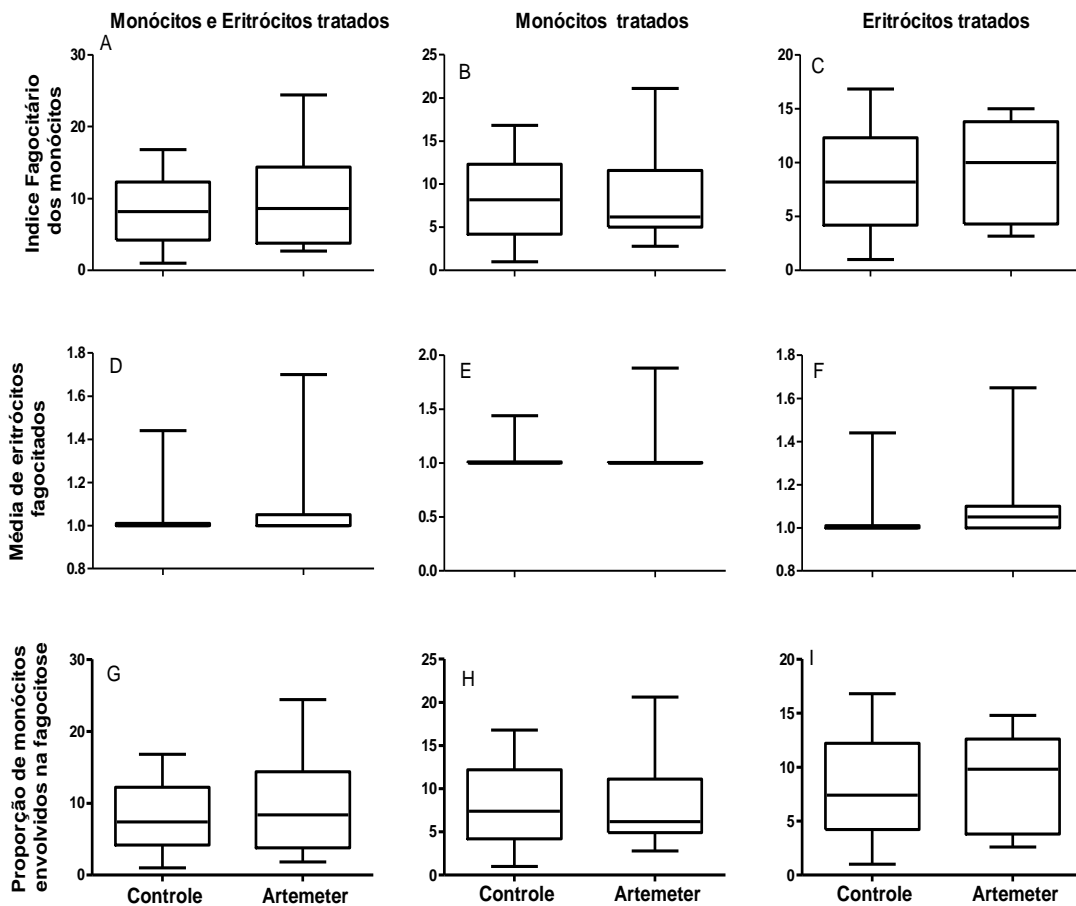


Figura 3. Influência do tratamento com artemeter sobre a fagocitose por monócitos. Os monócitos, os eritrócitos ou ambos foram tratados *in vitro* por 60 min. Foram utilizados 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados por escavação. A,B,C - Índice fagocitário; D,E,F- Média de parasitos/restos de parasitos ingeridos/aderidos por monócito; G,H,I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.1.1.3. Mefloquina

Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos infectados com *P. falciparum* de monócitos de indivíduos normais com mefloquina sobre a fagocitose por receptores para padrões moleculares para patógenos

A mefloquina também não influenciou a fagocitose, no tempo e na dose utilizada. (Figura 4).

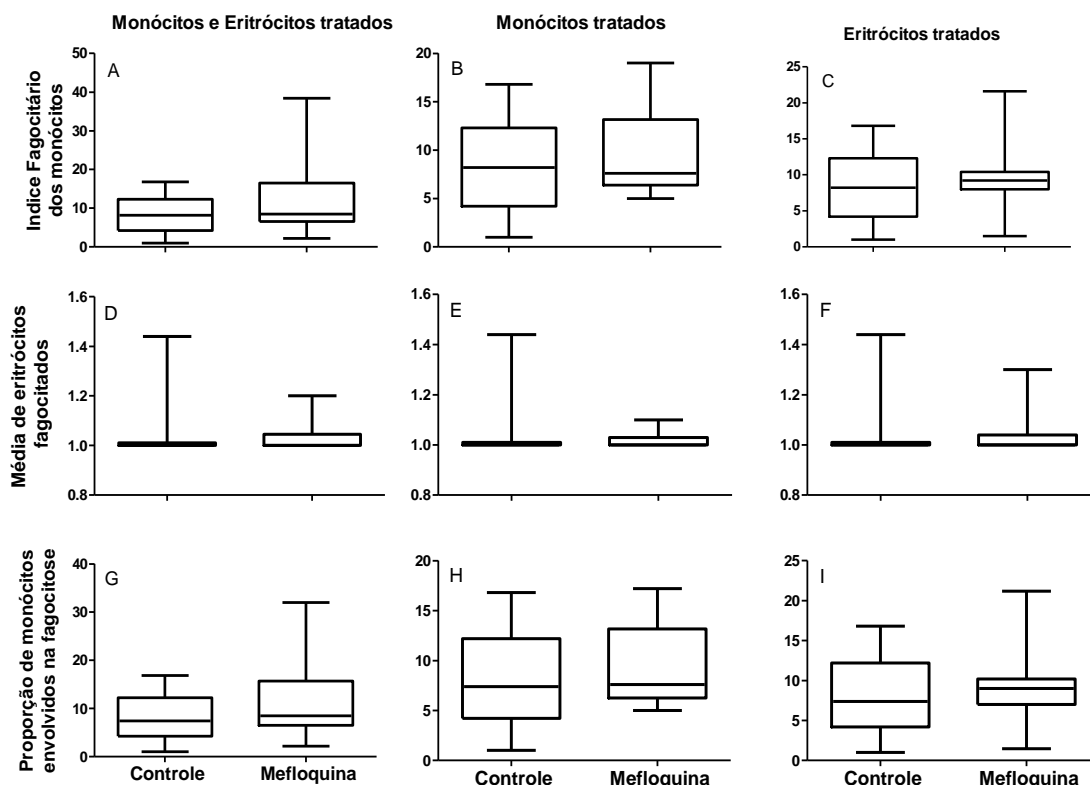


Figura 4. Influência do tratamento com mefloquina sobre a fagocitose por monócitos. Os monócitos, os eritrócitos ou ambos foram tratados *in vitro* por 60 min. Foram utilizados 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F- Média de parasitos/restos de parasitos ingeridos/aderidos por monócito; G, H, I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.1.2. Fagocitose total pelos receptores para opsoninas

4.1.2.1. Artemeter

Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos infectados com *P. falciparum* e/ou de monócitos de indivíduos normais com artemeter sobre a fagocitose por receptores para opsoninas.

O tratamento dos monócitos e eritrócitos infectados com *P. falciparum* com o artemeter por 60 min diminuiu a mediana do índice fagocitário dos

monócitos de 7,6 para 5,3 ($p = 0,029$, teste t), teve uma tendência para diminuir a mediana do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose de 7,6 para 5,25 ($p = 0,056$, teste de Mann Whitney), e não influenciou a mediana do número de parasitos fagocitados por monócitos (teste de Mann Whitney) (Figura 5).

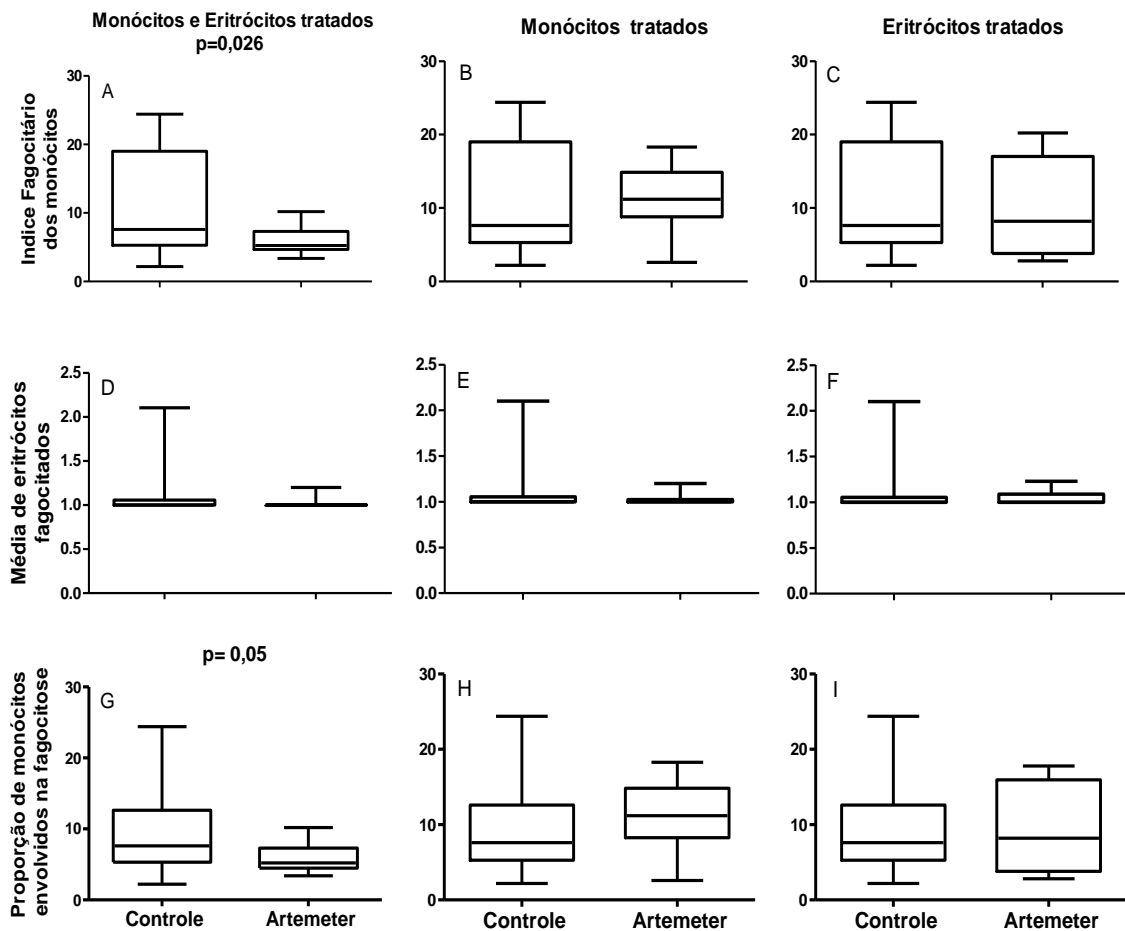


Figura 5 . Influência do tratamento *in vitro* de monócitos e eritrócitos infectados com *P. falciparum* com artemeter por 60 min sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados, por escavação. A,B,C - Índice fagocitário; D,E,F- Média de parasitos/restos de parasitos ingeridos/aderidos por monócito; G,H,I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A: Diminuição do índice fagocitário ($p=0,029$). Em G: tendência para diminuir o percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,05$).

4.1.2.2. Lumefantrina

Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos infectados com *P. falciparum* e/ou de monócitos de indivíduos normais com lumefantrina sobre a fagocitose por receptores para opsoninas.

O tratamento dos eritrócitos infectados e/ou monócitos com lumefantrina, quando os eritrócitos foram sensibilizados com o soro do doador, não modificou as medianas do índice fagocitário e da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, também não influenciou a média de parasitos fagocitados. (Figura 6).

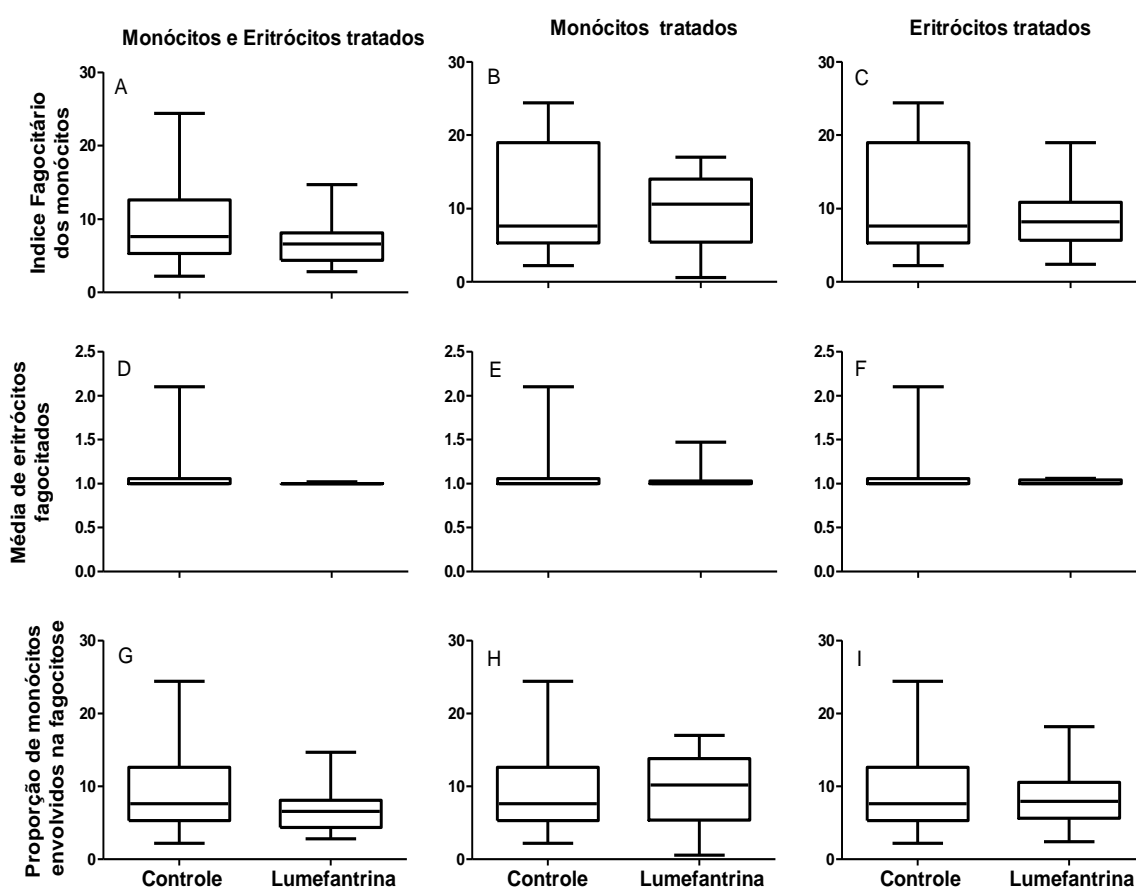


Figura 6. Influência do tratamento *in vitro* de monócitos e eritrócitos infectados com *P. falciparum* com lumefantrina por 60 min sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados com o soro do doador, por escavação. A,B,C - Índice fagocitário; D,E,F- Média de parasitos/restos de parasitos ingeridos/aderidos por monócito; G,H,I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.1.2.3. Mefloquina

Quando ambos monócitos e eritrócitos infectados foram tratados com mefloquina observou-se aumento da mediana do índice fagocitário de 7,6 para 13,9 e da mediana da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de 7,6 para 11,5 quando os eritrócitos foram sensibilizados com o soro do doador. Não houve influência sobre a média de parasitos fagocitados. Quando o tratamento foi feito isoladamente dos eritrócitos ou dos monócitos com mefloquina não houve influência no resultado. (Figura 7).

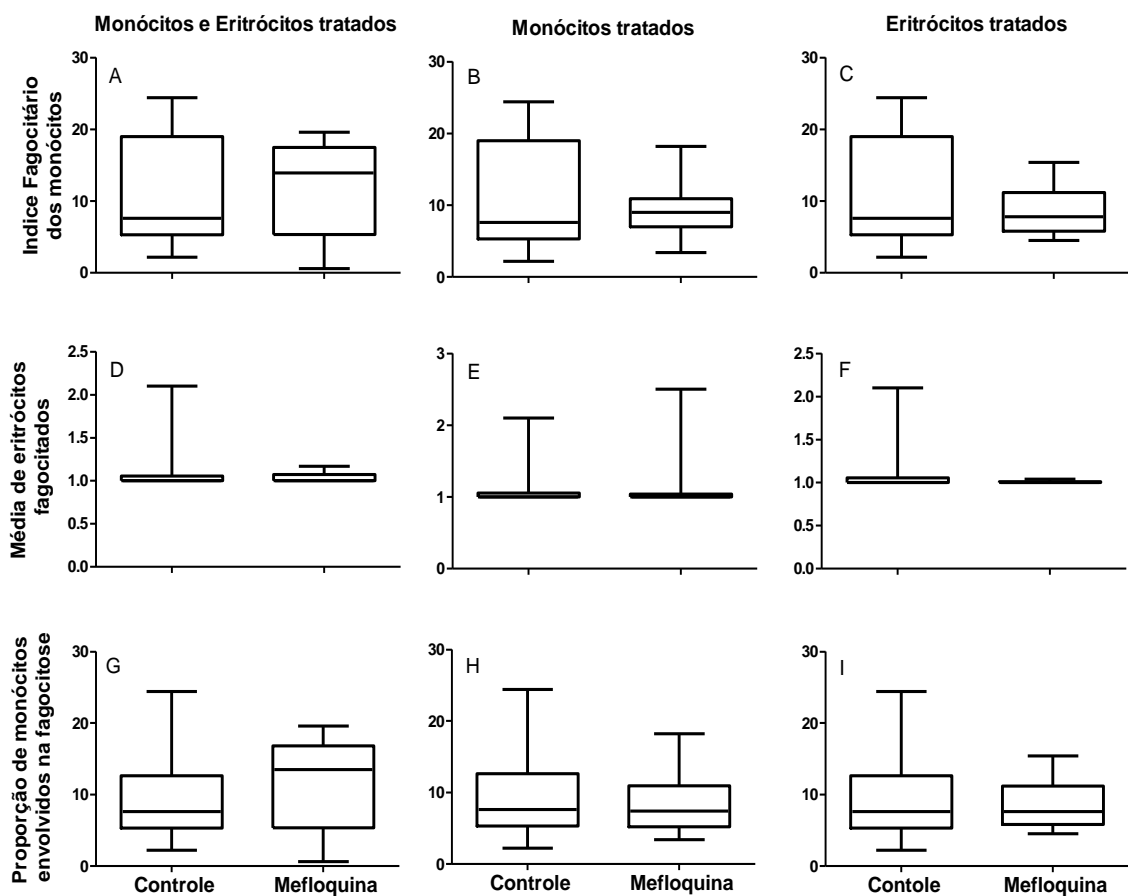


Figura 7. Influência do tratamento *in vitro* de monócitos e eritrócitos infectados com *P. falciparum* com mefloquina por 60 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados com o soro do doador, por escavação. A,B,C - Índice fagocitário; D,E,F- Média de parasitos/restos de parasitos ingeridos/aderidos por monócito; G,H,I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.2.1. Função fagocitária discriminando apenas as partículas de hemozoína quando avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos

4.2.1.1. Mefloquina

O tratamento dos eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados com mefloquina por 60 min aumentou a média de partículas de hemozoína ingeridas de 1,001 para 1,048 ($p= 0,0169$ teste de Mann Whitney), não havendo influência sobre o IF ou a proporção de partículas fagocitadas. Não observamos alteração da fagocitose quando a mefloquina foi incubada isoladamente com os monócitos ou eritrócitos. (Figura 8).

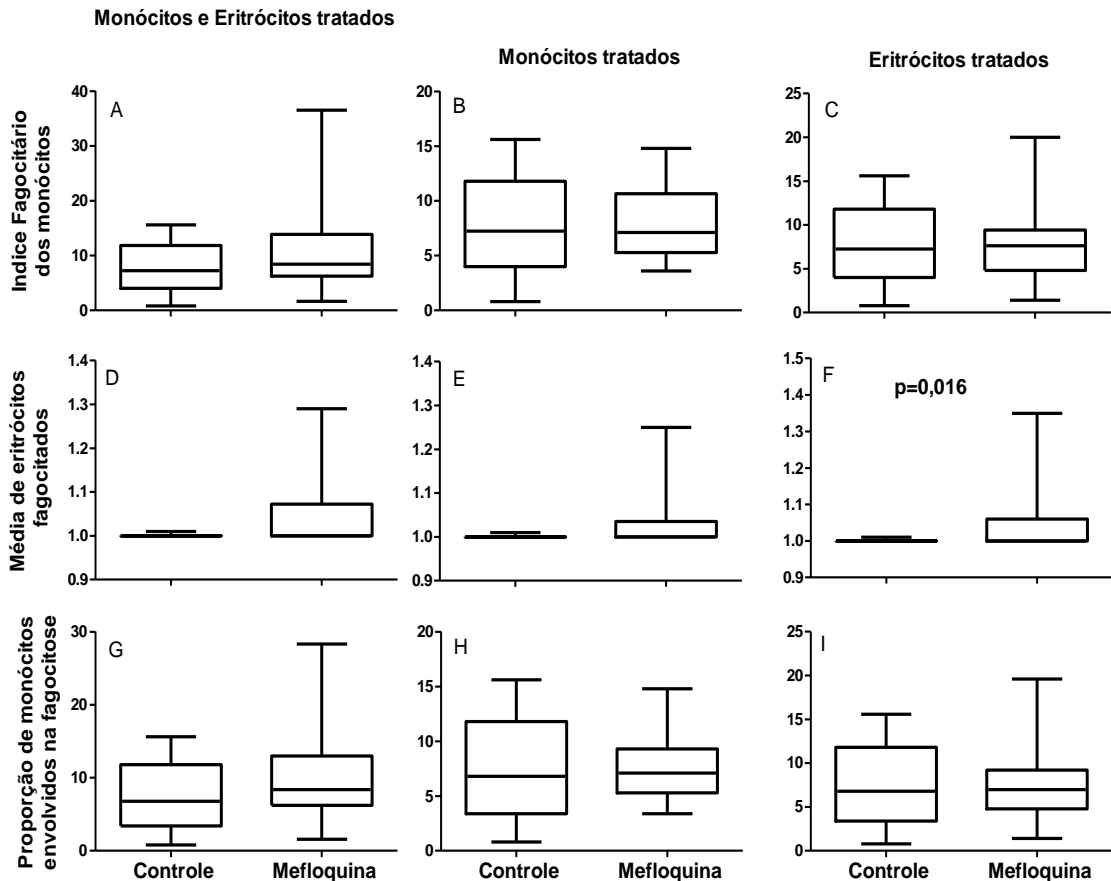


Figura 8. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos infectados e monócitos com mefloquina por 60 min sobre a capacidade fagocitária, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F- hemozoínas ingeridas/aderidas por monócito; G, H, I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em F aumento da média de hemozoína fagocitada($p= 0,0169$).

4.2.1.2. Lumefantrina

A lumefantrina não modificou o resultado da fagocitose de hemozoína por receptores para padrões moleculares de patógenos quando tratados ambos eritrócitos e monócitos e quando tratado isoladamente os monócitos, porém teve uma tendência para aumentar a mediana do IF quando os eritrócitos infectados foram tratados isoladamente ($p=0,05$, teste t). (Figura 9).

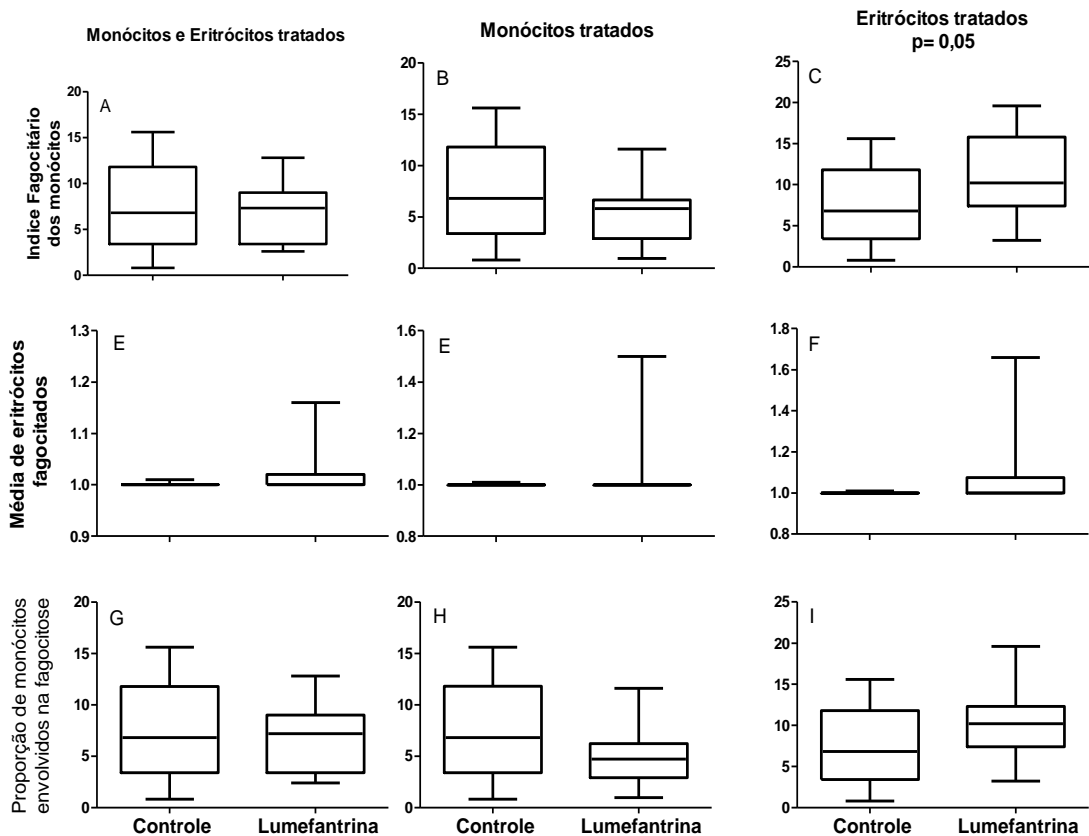


Figura 9. Influência do tratamento *in vitro* de monócitos e eritrócitos infectados com lumefantrina por 60 min sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados, por escavação. A,B,C - Índice fagocitário; D,E,F- Média de hemozoínas ingeridas/aderidas por monócito; G,H,I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em C tendência em aumentar a mediana do índice fagocitário ($p=0,05$).

4.2.1.3. Artemeter

O artemeter não influenciou a fagocitose *in vitro* de hemozoína pelos receptores para padrões moleculares de patógenos. (Figura 10).

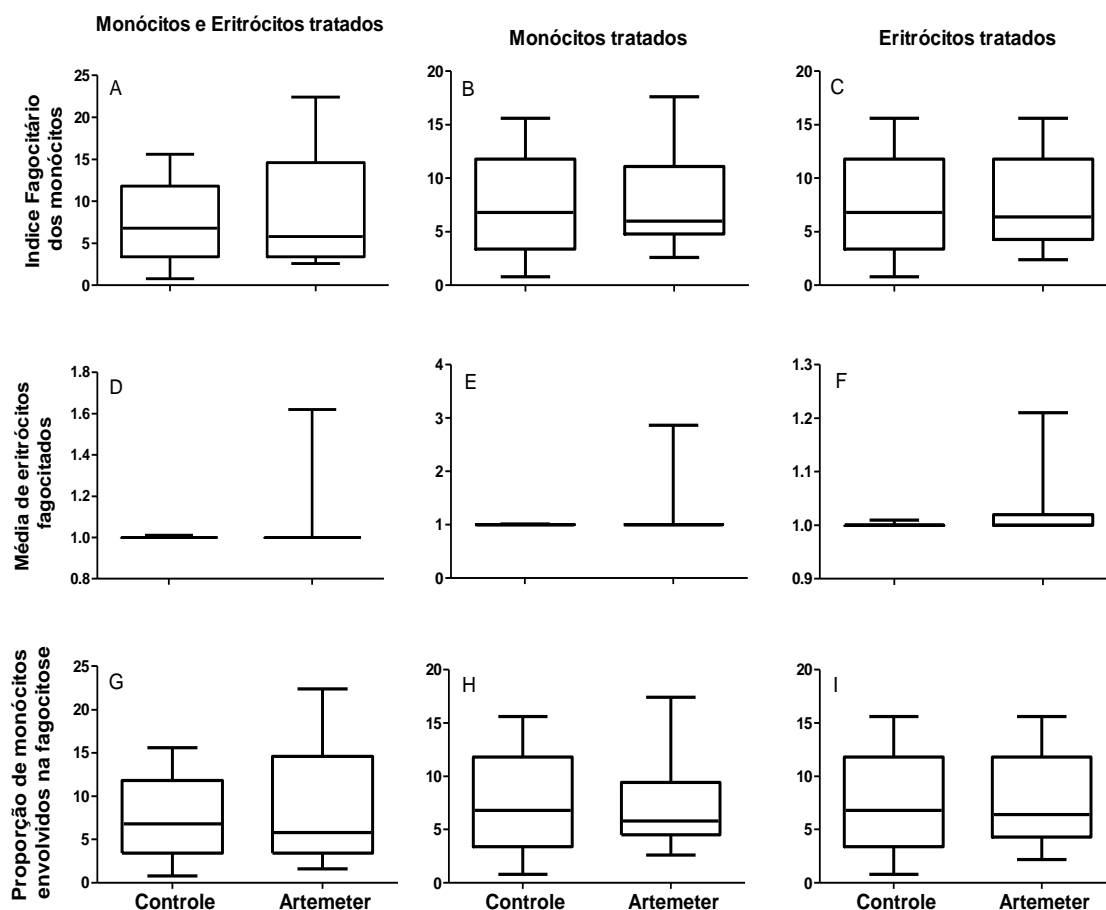


Figura 10. Influência do tratamento *in vitro* de monócitos e eritrócitos infectados com artemeter por 60 min sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados, por escavação. A,B,C - Índice fagocitário; D,E,F- Média de hemozoínas ingeridas/aderidas por monócito; G,H,I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.2.2. Função fagocitária discriminando apenas partículas de hemozoína quando avaliada pelos receptores para opsoninas

4.2.2.1. Artemeter

O tratamento dos eritrócitos infectados com *P. falciparum* e dos monócitos de indivíduos normais com artemeter, por 60 min, quando os

eritrócitos foram sensibilizados com o soro do próprio doador, diminuiu a mediana do índice fagocitário de 7,4 para 4,6 $p= 0,036$, teste t; teve uma tendência para diminuir a mediana da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose $p= 0,5$, teste t; entretanto, não influenciou a na média de hemozoínas fagocitadas. (Figura 11).

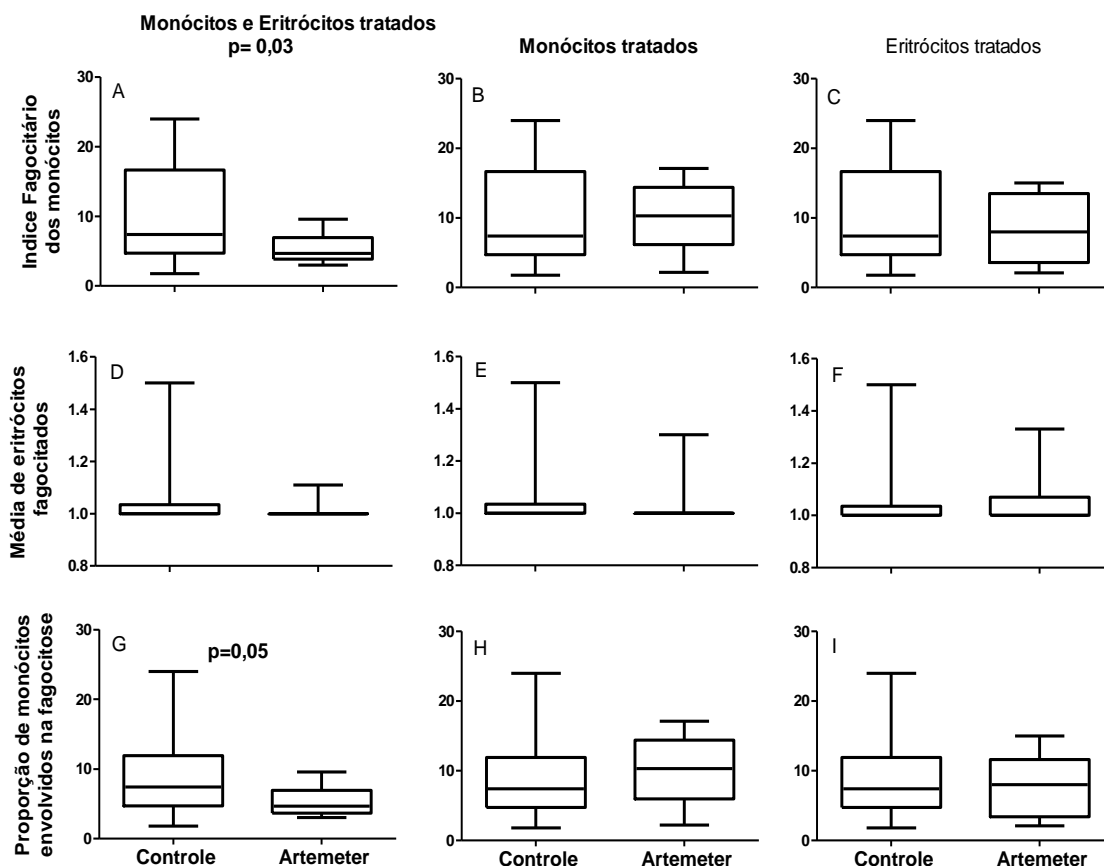


Figura 11. Influência do tratamento *in vitro* de monócitos e eritrócitos infectados com artemeter por 60 min sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados com o soro do doador, por escavação. A,B,C - Índice fagocitário; D,E,F- Média de hemozoína ingeridos/aderidos por monócito; G,H,I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A. diminuiu a mediana do índice fagocitário ($p= 0,03$). Em G tendência para diminuir a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de hemozoína ($p= 0,05$).

4.2.2.2. Lumefantrina

A lumefantrina não modificou o resultado da fagocitose de hemozoína por receptores para opsoninas. (Figura 12).

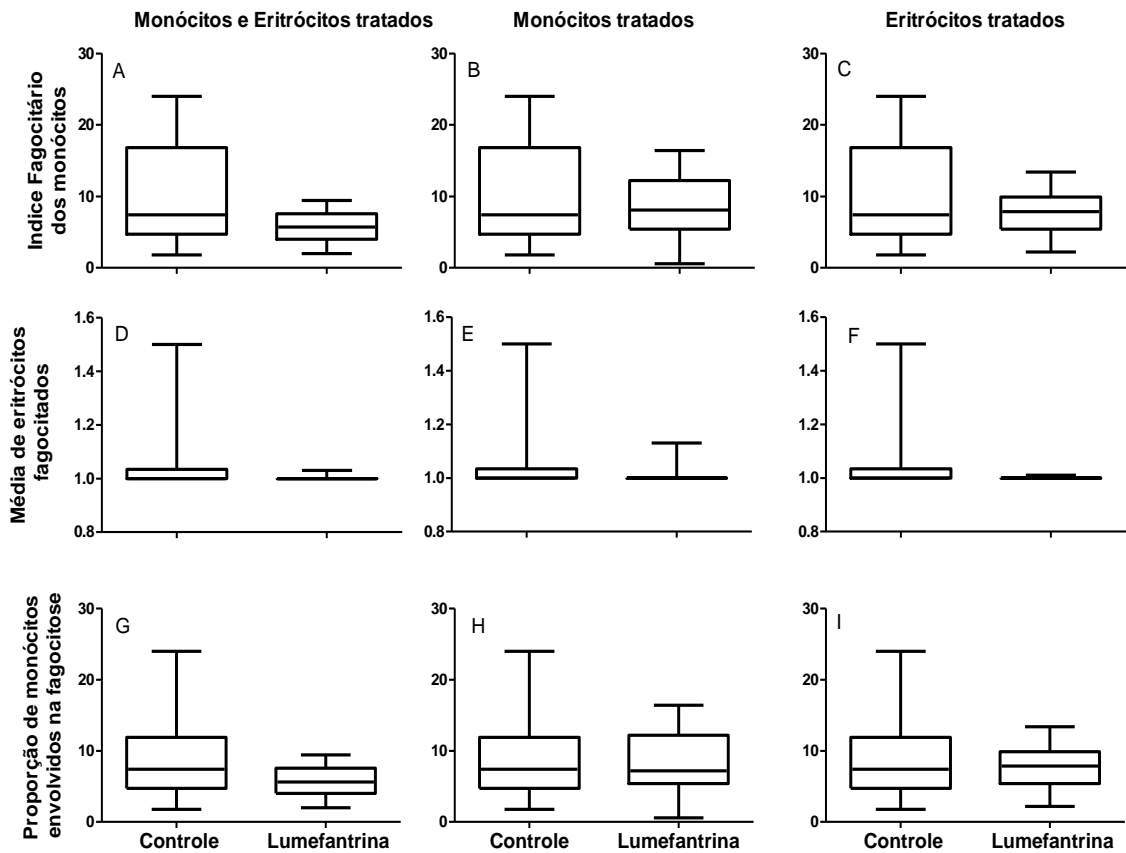


Figura 12. Influência do tratamento *in vitro* de monócitos e eritrócitos infectados com lumefantrina por 60 min sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados com o soro do doador, por escavação. A,B,C - Índice fagocitário; D,E,F- Média de hemozoína ingeridas/aderidas por monócito; G,H,I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.4.3. Mefloquina

O tratamento com a mefloquina também não alterou o resultado da fagocitose de hemozoína por receptores para opsoninas. (Figura 13).

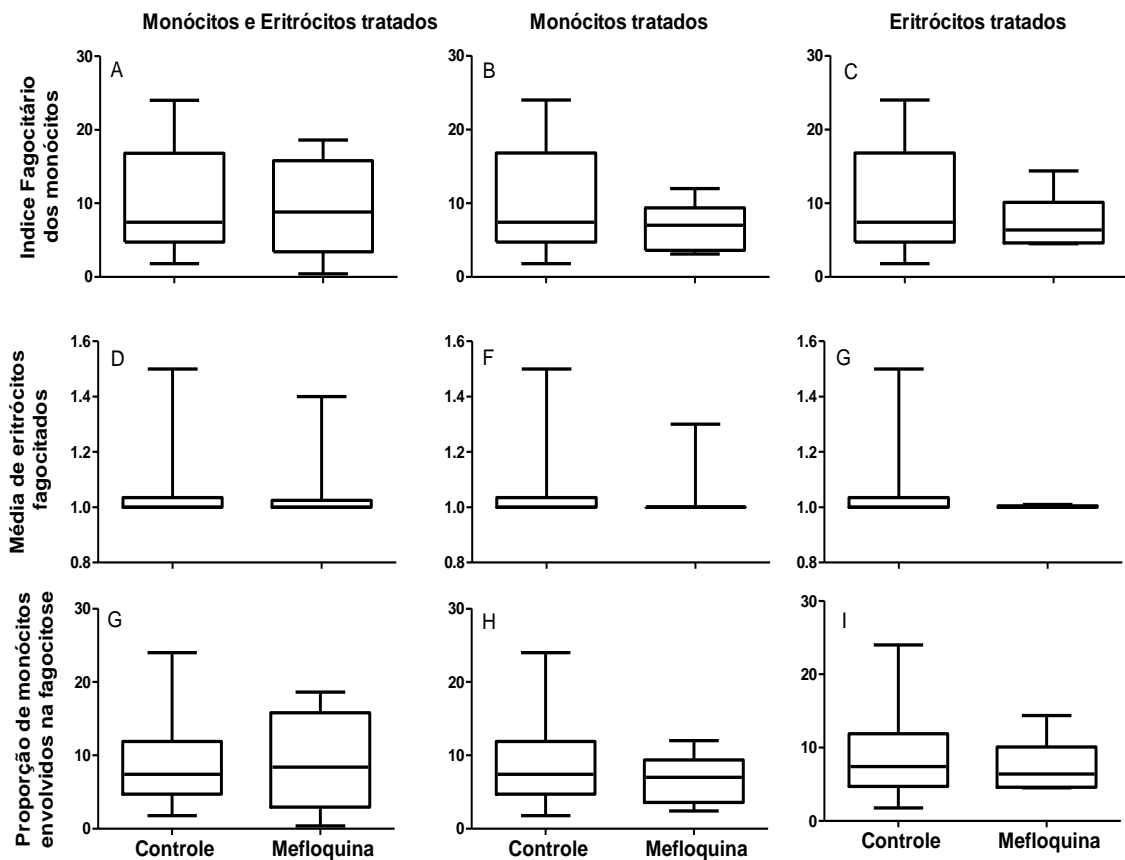


Figura 13. Influência do tratamento *in vitro* de monócitos e eritrócitos infectados com mefloquina por 60 min sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados com o soro do doador, por escavação. A,B,C - Índice fagocitário; D,E,F- Média de hemozoína ingeridos/aderidos por monócito; G,H,I- Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.3.1. Função fagocitária discriminando apenas esquizontes quando avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.

Verificamos a influência do tratamento de eritrócitos infectados e monócitos de indivíduos normais com os antimaláricos artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a capacidade fagocitária, pelo teste de fagocitose em placa analisando a ingestão das formas em esquizonte dos parasitos.

4.3.1.1. Lumefantrina

A lumefantrina diminuiu a mediana do índice fagocitário de 0,2 para 0 ($p=0,0065$, teste Mann Whitney), a mediana da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de 0,2 para 0 ($p=0,0065$, teste Mann Whitney) e diminuiu a mediana do número de parasitos fagocitados por monócito de 1 para 0 ($p=0,0069$, teste Mann Whitney), quando tratamos apenas os monócitos por 60 min. (Figura 14).

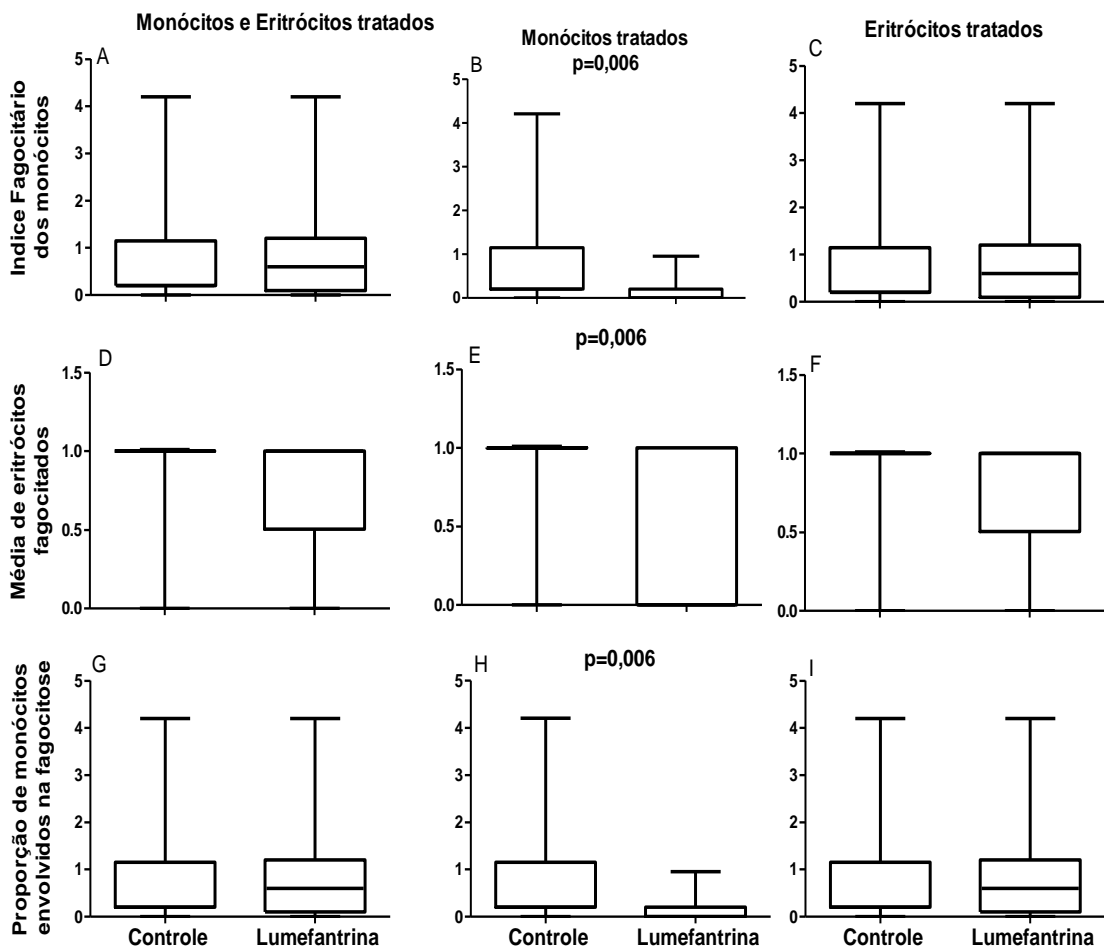


Figura 14. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos tratados com lumefantrina por 60 min sobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma de esquizonte, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D,E,F - Média de esquizontes ingeridos/aderidos por monócitos; G,H,I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em B: Diminuiu a mediana do índice fagocitário ($p=0,0065$). Em E: Diminuiu a mediana de esquizontes

ingeridos/aderidos por monócitos ($p= 0,0069$). Em H: Reduziu o percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,0065$).

4.3.1.2. Artemeter

O Artemeter não influenciou a fagocitose de esquizontes quando os eritrócitos não foram sensibilizados. (Figura 15).

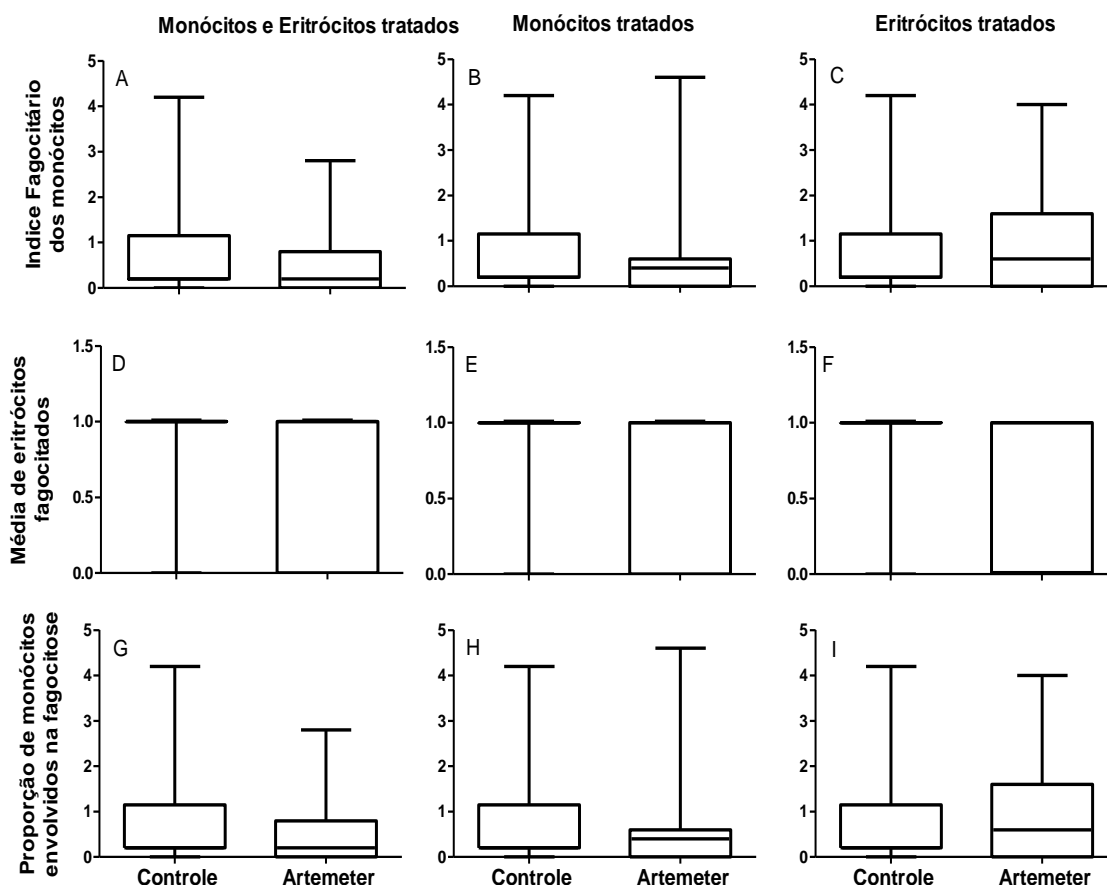


Figura15. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos tratados com artemeter por 60 min sobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma de esquizonte, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D,E,F - Média de esquizontes ingeridos/aderidos por monócitos; G,H,I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.3.1.3. Mefloquina

O tratamento de eritrócitos e monócitos com mefloquina por 60 min não modificou a capacidade fagocitário dos monócitos para o parasito na forma de esquizonte, quando os eritrócitos não foram sensibilizados. (Figura16).

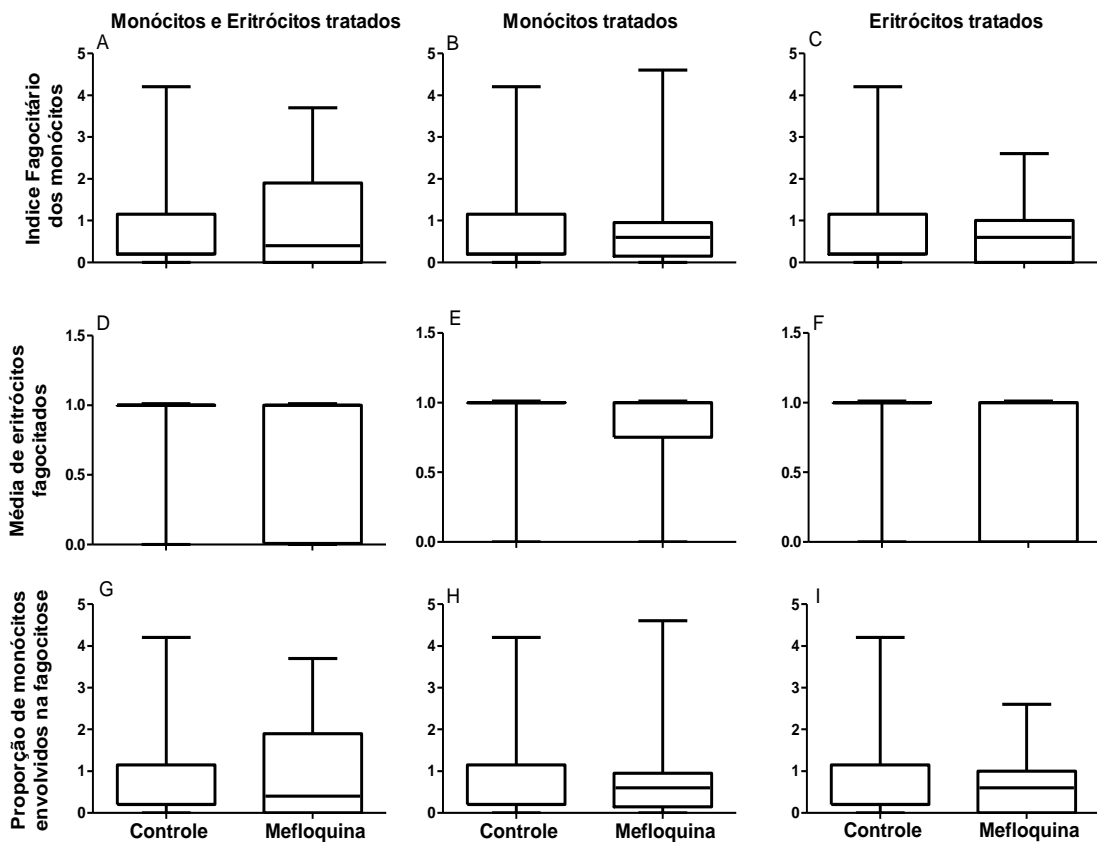


Figura 16. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos tratados com mefloquina por 60 min sobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma de esquizonte, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D,E,F - Média de esquizontes ingeridos/aderidos por monócitos; G,H,I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.3.2. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos infectados com *P. falciparum* e de monócitos de indivíduos normais com artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a fagocitose de de esquizonte por receptores para opsoninas.

4.3.2.1. Lumefantrina

O tratamento dos monócitos e eritrócitos infectados com lumefantrina por 60 min teve uma tendência para diminuir número de esquizontes fagocitados por monócito ($p= 0,05$, teste Mann Whitney), não influenciando a mediana do índice fagocitário e a mediana da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, quando os eritrócitos foram sensibilizados com o soro do doador. (Figura 17).

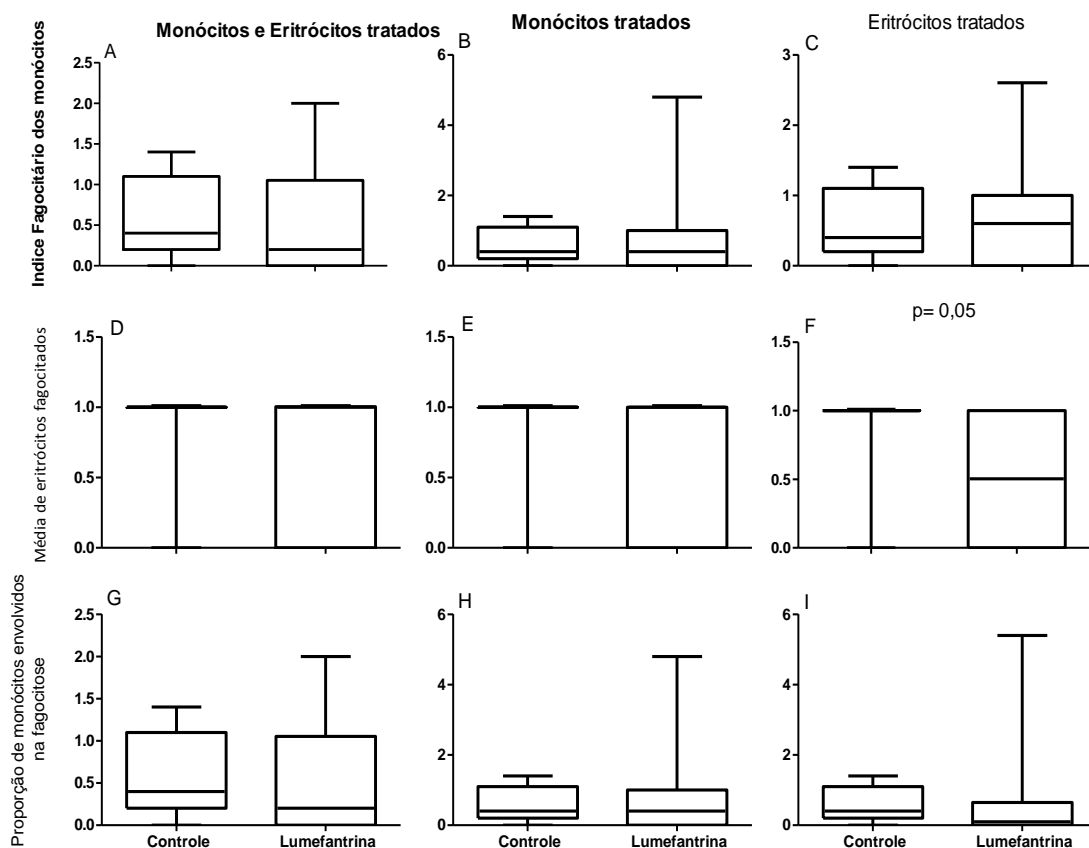


Figura 17. Influência do tratamento in vitro de eritrócitos tratados com lumefantrina por 60 min sobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma de esquizonte, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F - Média de esquizontes ingeridos/aderidos por monócitos; G,H,I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em F: tendência em diminuir o número de esquizontes fagocitados por monócito.

4.3.2.2. Mefloquina

O tratamento dos monócitos e eritrócitos infectados com mefloquina por 60 min teve uma tendência para diminuir a média de esquizontes fagocitados ($p= 0,05$, teste Mann Whitney) não influenciando a mediana do índice fagocitário e a mediana da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, quando os eritrócitos foram sensibilizados com o soro do doador. (Figura 18).

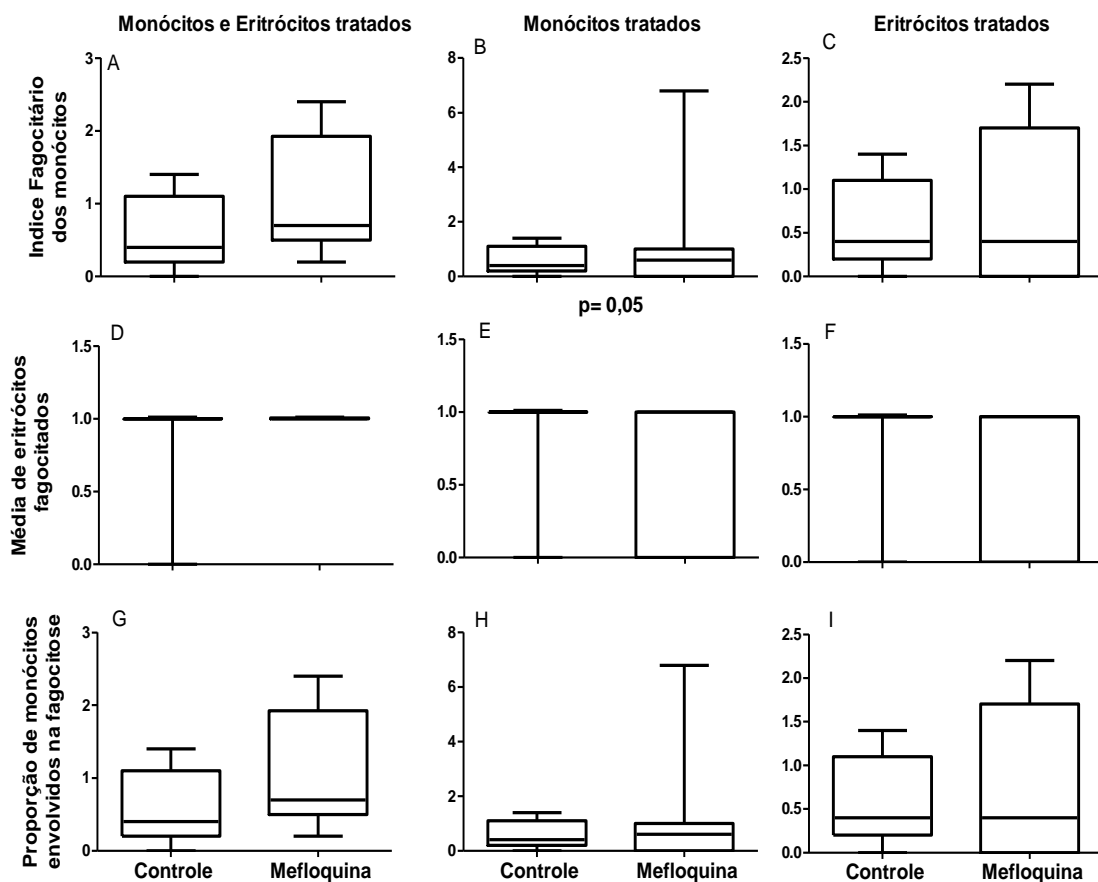


Figura 18. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos tratados com mefloquina por 60 min sobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma de esquizonte, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F - Média de esquizontes ingeridos/aderidos por monócitos; G, H, I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em E: tendência em diminuir a média de esquizontes fagocitados.

4.3.2.3. Artemeter

O artemeter não influenciou a fagocitose de parasitos na forma de esquizonte por receptores para opsoninas, quando tratados *in vitro* monócitos e eritrócitos por 60 min. (Figura 19).

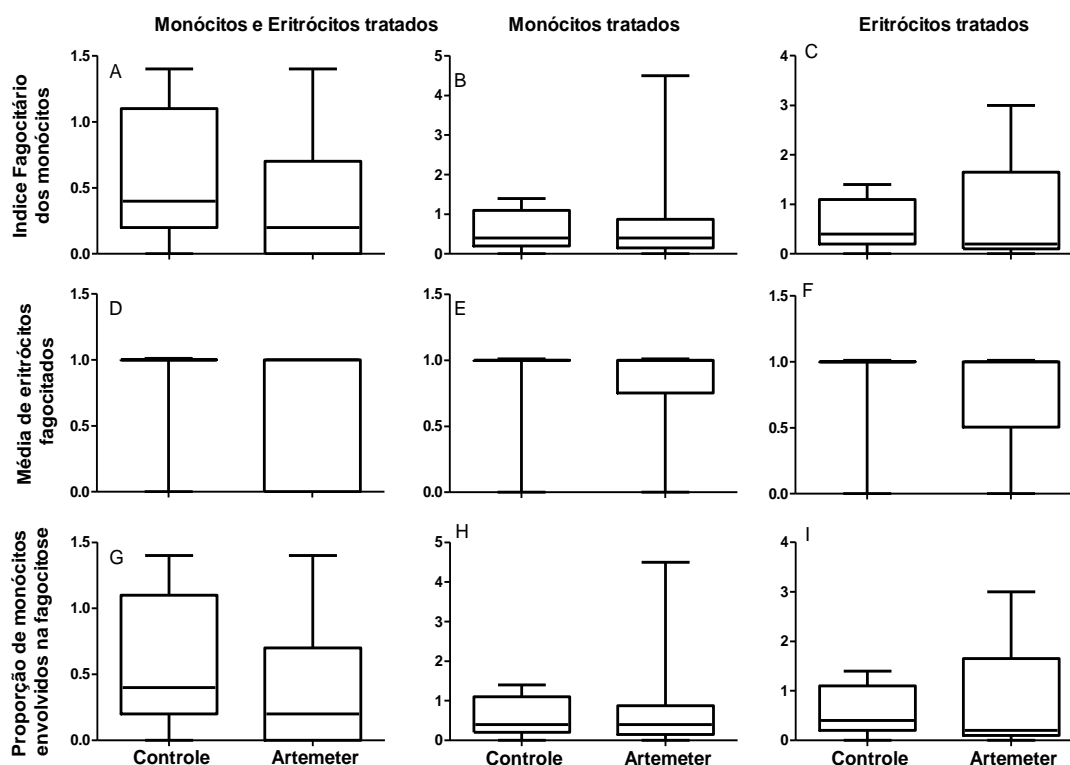


Figura 19. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos tratados com artemeter

por 60 min sobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma de esquizonte, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F - Média de esquizontes ingeridos/aderidos por monócitos; G, H, I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.4.1. Função fagocitária discriminando apenas as formas em anel quando avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.

4.4.1.1. Artemeter

O artemeter aumentou as medianas do índice fagocitário e da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de parasitos na forma de anel de 0 para 0,4 ($p= 0,0171$, teste Mann Whitney), mas não influenciou a média de parasitos fagocitados, quando os eritrócitos parasitados foram tratados isoladamente. (Figura 20).

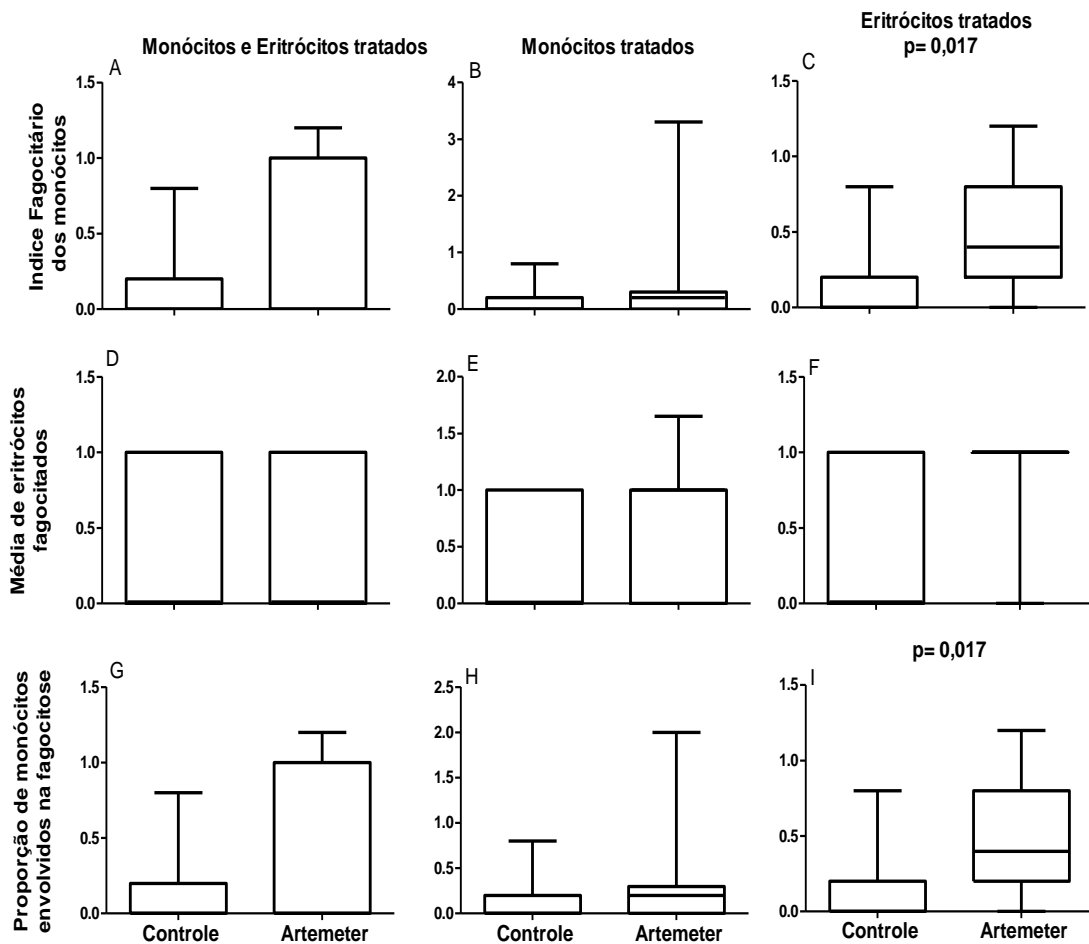


Figura 20. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos com artemeter por 60 min

sobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma em anel, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F - Média de parasitos ingeridos/aderidos por monócitos; G, H, I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em C: aumento do índice fagocitário ($p=0,017$). Em I: Aumentou do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,017$) teste de Mann Whitney.

4.4.1.2. Lumefantrina

A lumefantrina não influenciou o resultado da fagocitose de parasitos na forma em anel por receptores para padrões moleculares para patógenos, quando tratados os monócitos e os eritrócitos por 60 min. (Figura 21).

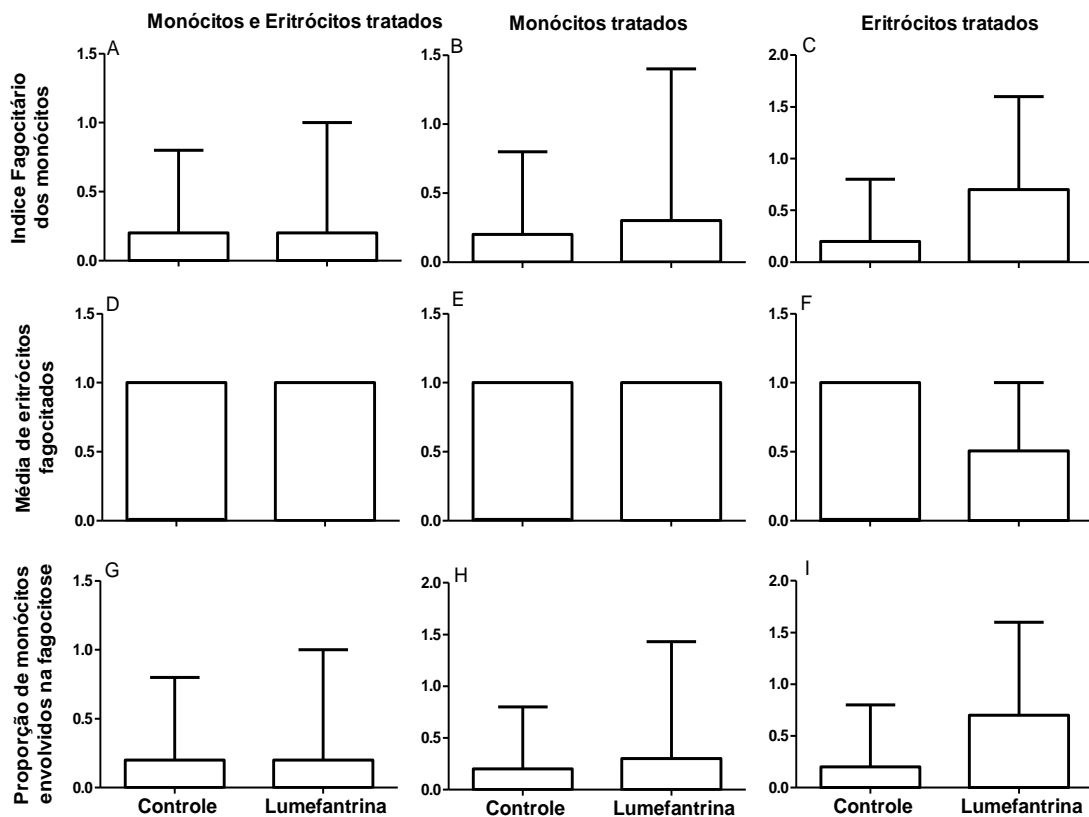


Figura 21. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos com lumefantrina por 60 minsobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma em anel, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F - Média de parasitos ingeridos/aderidos por monócitos; G, H, I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.4.1.3. Mefloquina

A Mefloquina não modificou o resultado da fagocitose de parasitos na forma em anel por receptores para padrões moleculares para patógenos, quando tratados os monócitos e os eritrócitos por 60 min. (Figura 22).

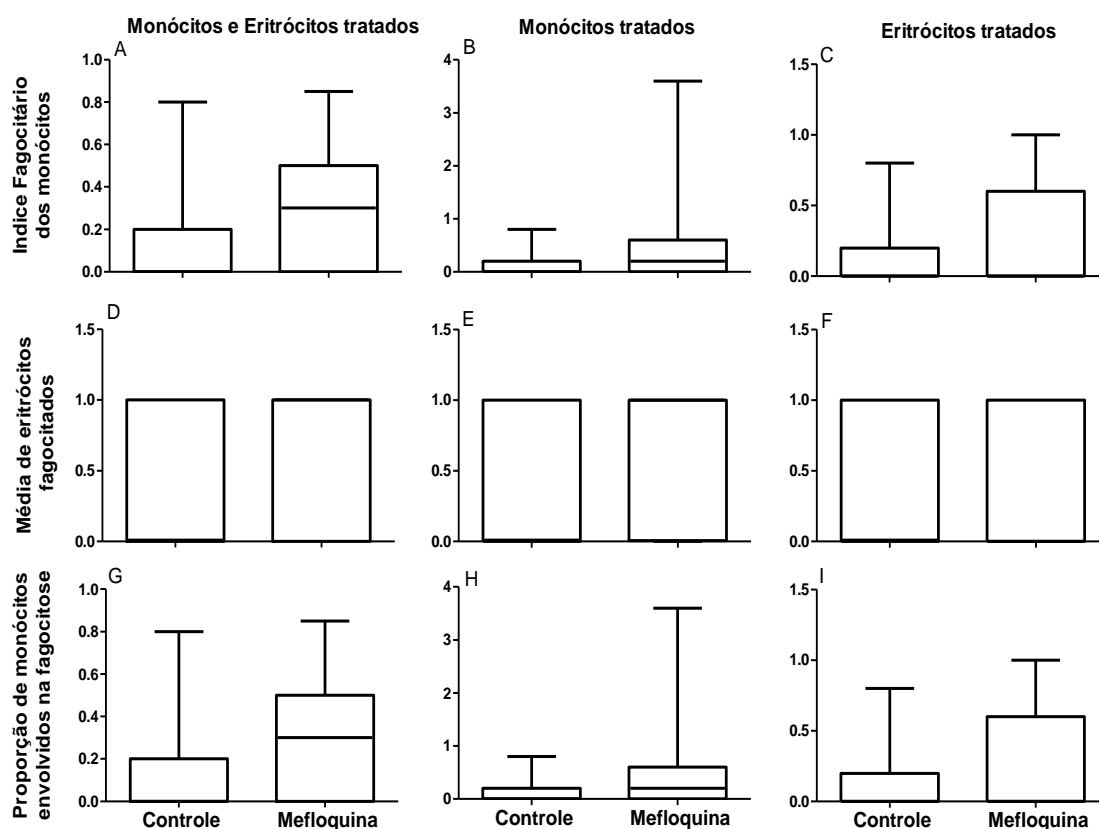


Figura 22. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos com mefloquina por 60 min sobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma em anel, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizados por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F - Média de parasitos ingeridos/aderidos por monócitos; G, H, I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.4.2. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos infectados com *P. falciparum* e de monócitos de indivíduos normais com artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a fagocitose de parasitos na forma em anel por receptores para opsoninas.

4.4.2.1. Artemeter

O tratamento dos monócitos e eritrócitos infectados com *P. falciparum* com artemeter por 60 min não alterou a fagocitose de parasitos na forma em anel, por receptores para opsoninas (teste de Mann Whitney). (Figura 23).

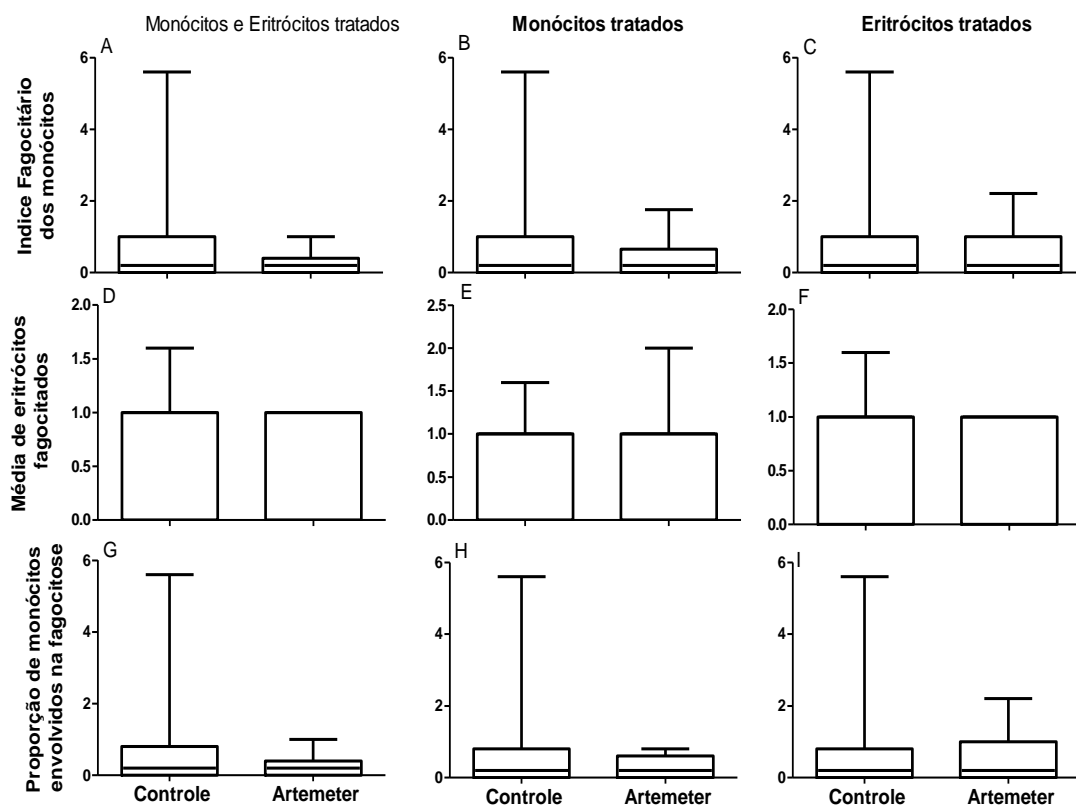


Figura 23. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos com artemeter por 60 min sobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma em anel, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados com o soro do doador, por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F - Média de parasitos ingeridos/aderidos por monócito; G, H, I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.4.2.2. Lumefantrina

A lumefantrina não influenciou a fagocitose pelos receptores para opsoninas das formas em anel. (Figura 24).

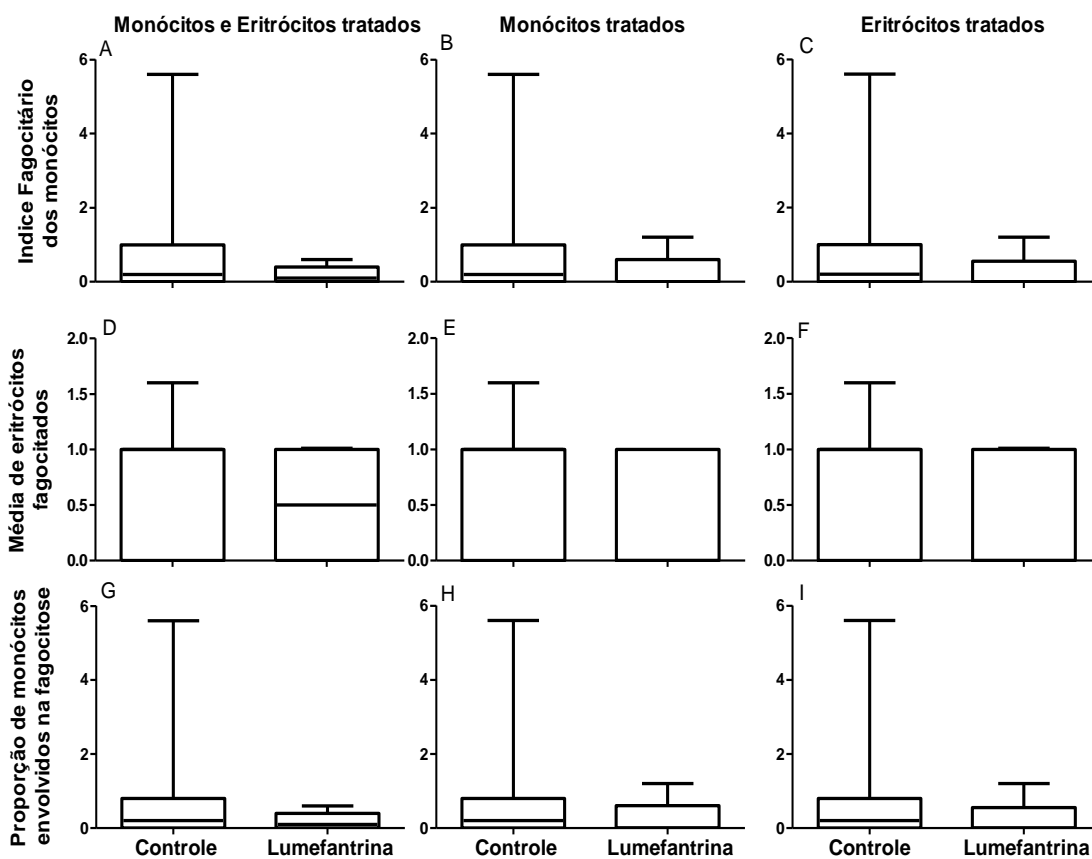


Figura 24. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos com lumefantrina por 60 minsobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma em anel, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados com o soro do doador, por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F - Média de parasitos ingeridos/aderidos por monócitos; G, H, I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.4.2.3. Mefloquina

O tratamento dos eritrócitos infectados e monócitos com mefloquina quando os eritrócitos foram sensibilizados com o pasma do doador não modificou as medianas do índice fagocitário e da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, não alterou a média de parasitos na forma em anel fagocitados. (Figura 25).

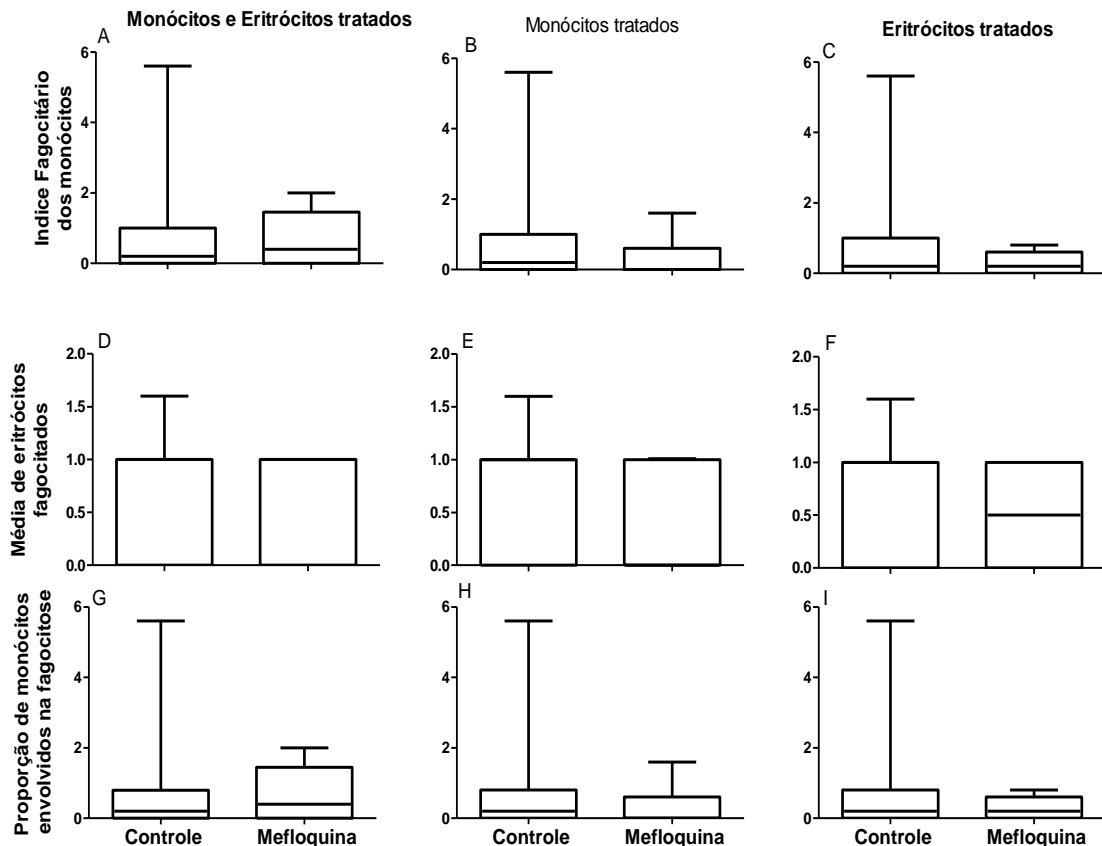


Figura 25. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos com mefloquina por 60 minutos sobre a capacidade fagocitária de monócitos para os parasitos em forma em anel, utilizando 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados com o soro do doador por escavação. A, B, C - Índice fagocitário; D, E, F - Média de parasitos ingeridos/aderidos por monócitos; G, H, I - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.5. Corpúsculos lipídicos

Influencia dos antimaláricos artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos de indivíduos normais quando estimulados com os eritrócitos infectados com *plasmódio falciparum*

A influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos infectados e/ou monócitos de indivíduos normais com os antimaláricos artemeter, lumrfantrina e mefloquina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos foi avaliada pela coloração dos monócitos estimulados com o *oil red O*.

A expressão de corpos lipídicos foi avaliada quando os monócitos foram estimulados com eritrócitos infectados fagocitados pelos receptores para

padrões moleculares de patógenos, e a mediada por receptores para opsoninas.

A expressão dos corpúsculos lipídicos foi expressa pelo índice corpuscular, a média de corpúsculos lipídicos expressos por monócito e o percentual de monócitos expressando corpúsculo lipídico.

4.5.1. Influência dos antimaláricos sobre a expressão corpúsculos lipídicos pelos monócitos quando estimulados por eritrócitos parasitados não sensibilizados.

4.5.1.1. Artemeter

O tratamento dos eritrócitos infectados não sensibilizados e monócitos por 60 min com artemeter diminuiu 1,74 vezes o valor da mediana do índice corpuscular dos monócitos ($p = 0,004$, teste t), sendo que não houve diferença no percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos, porém, o número de corpúsculos lipídicos expressos por monócito foi 1,45 vezes menor após o tratamento com a droga, ($p = 0,034$, teste t). Quando tratamos somente os eritrócitos parasitados com a droga, houve diminuição em 4,35 vezes na mediana do índice corpuscular, ($p = 0,008$, teste t), diminuição na mediana do percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos em 2,6 vezes ($p = 0,026$, teste t), e também diminuição no número de corpúsculos lipídicos expresso por monócito em 1,7 vezes ($p = 0,049$, teste t). (Figura 26).

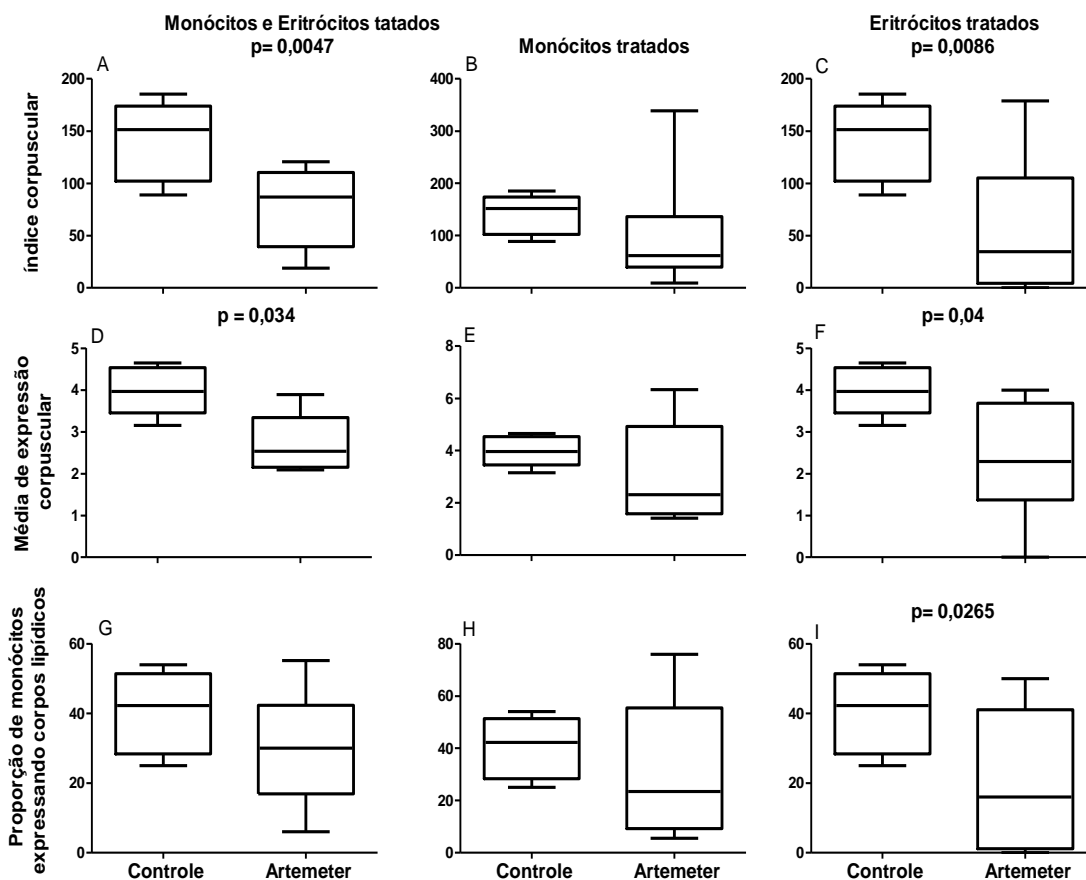


Figura 26. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos e/ou monócitos com artemeter por 60 min sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos estimulados com 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizado por escavação. A B, C- Índice corpuscular; D, E F - Média de expressão corpuscular por monócitos; G, H, I - Percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos. Em A e C: Diminuição do índice corpuscular ($p=0,004$, $p= 0,008$). Em D e F: Diminuição da expressão corpuscular pelos monócitos ($p = 0,03$, $p = 0,04$). Em I: Diminuiu o percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos ($p= 0,026$)

4.5.1.2. Lumefantrina

O tratamento dos eritrócitos infectados não sensibilizados e dos monócitos por 60 min com lumefantrina diminuiu a mediana do índice corpuscular dos monócitos de 151,5 para 80 e a mediana de monócitos expressando corpúsculos lipídicos de 42,25 para 24, sendo que correspondeu à diminuição de 1,48 vezes ($p = 0,02$, teste t). O tratamento dos eritrócitos infectados isoladamente por 60 min com lumefantrina diminuiu o valor da mediana do índice corpuscular dos monócitos de 151,5 para 94 e a mediana de monócitos expressando corpúsculos lipídicos de 42,25 para

30,5,1,27 vezes menos, ($p=0,022$, teste t). O tratamento somente dos monócitos por 60 min com a lumefantrina diminuiu a mediana do índice corpuscular dos monócitos 3,6 vezes, de 151,5 para 41,13 ($p= 0,006$, teste t), a mediana de monócitos expressando corpúsculos lipídicos diminuiu 3,1 vezes, de 42,25 para 13,5 ($p= 0,014$, teste t). (Figura 27).

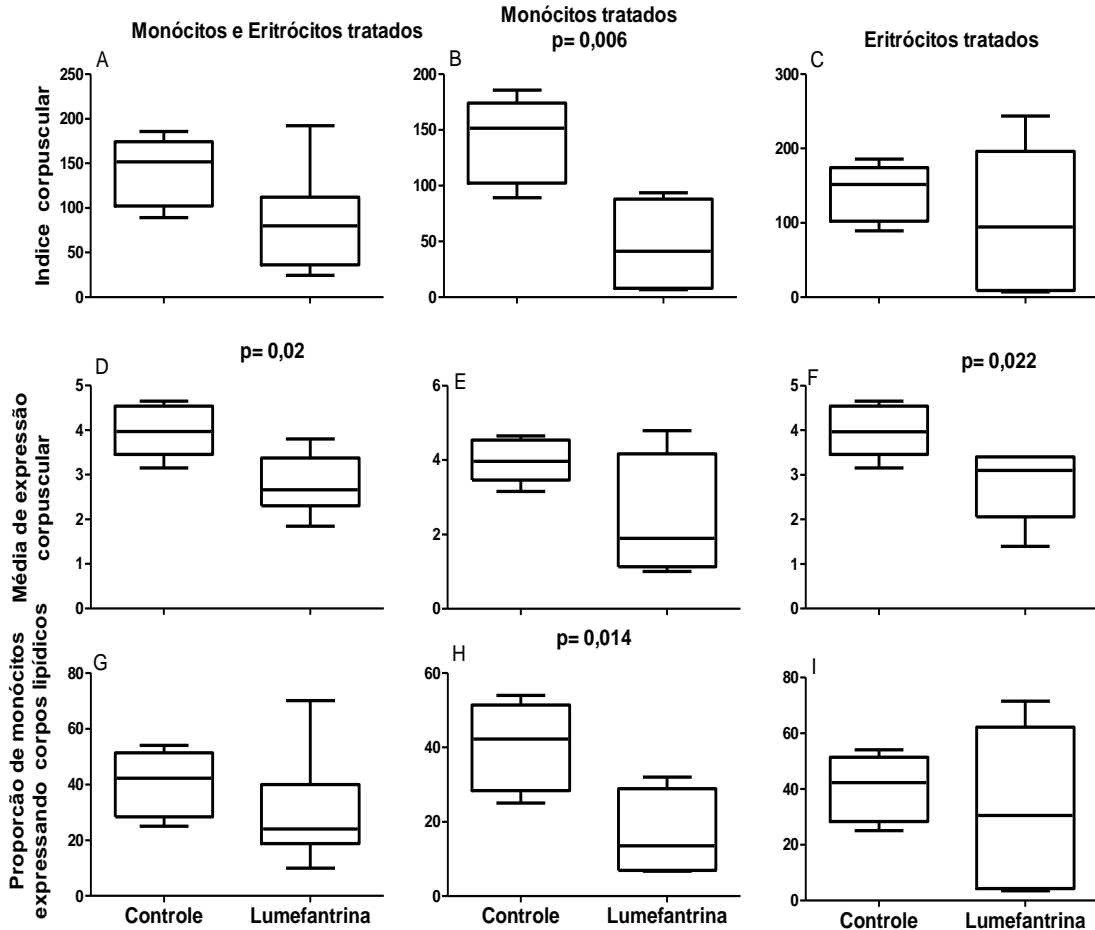


Figura 27. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos e/ou monócitos com lumefantrina por 60 min sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos estimulados com 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizado por escavação. A, B, C - Índice corpuscular; D, E, F - Média de expressão corpuscular por monócitos; G, H, I - Percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos. Em B: Houve diferença significativa do índice corpuscular ($p= 0,006$). Em D e F: Diminuiu expressão corpuscular pelos monócitos ($p= 0,02$). Em H: Houve diferença significativa do percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos ($p= 0,014$).

4.5.1.3. Mefloquina

O tratamento dos eritrócitos infectados por 60 min com mefloquina diminuiu a mediana do índice corpuscular dos monócitos de 2,14 vezes, de 151,5 para 70,5 ($p= 0,05$, teste t), a diminuição na mediana do número de monócitos expressando corpúsculos lipídicos foi 1,68 vezes, passando

de 3,96 para 2,35 ($p = 0,027$, teste t). O tratamento dos monócitos isoladamente diminuiu a mediana de expressão corpuscular de 3,96 para 1,59 ($p = 0,0007$, teste t). O tratamento dos eritrócitos infectados e dos monócitos diminuiu o valor da mediana do índice corpuscular dos monócitos de 151,5 para 31,5 e da mediana de monócitos expressando corpúsculos lipídicos de 42,25 para 13,5. (Figura 28).

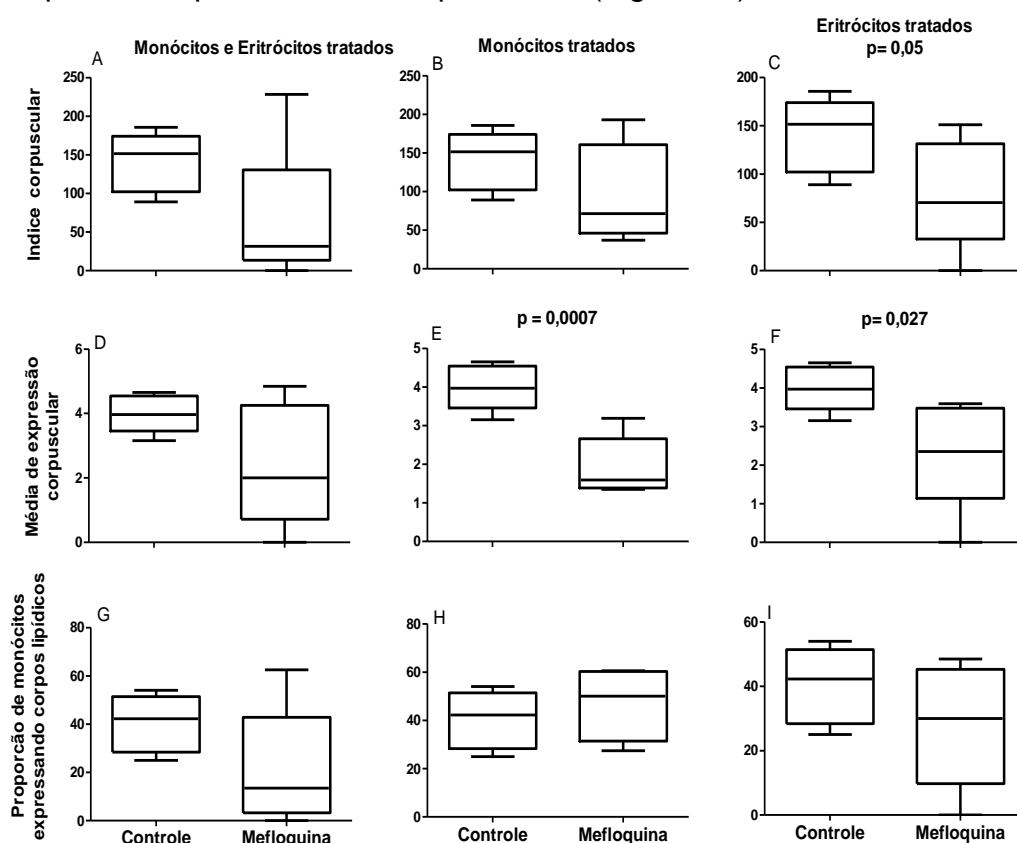


Figura 28. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos e/ou monócitos com mefloquina por 60 min sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos estimulados com 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* não sensibilizado por escavação. A, B, C - Índice corpuscular; D, E, F - Média de expressão corpuscular por monócito; G, H, I - Percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos. Em c: Tendência para diminuir a mediana do índice corpuscular ($p = 0,05$). Em E, F: Diminuiu a mediana da expressão corpuscular ($p = 0,0007$ e $p = 0,027$).

4.5.2. Influência do tratamento *in vitro* com artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos por monócitos estimulados com eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizados.

4.5.2.1. Artemeter

O tratamento dos monócitos de indivíduos com artemeter, por 60 min quando os eritrócitos foram sensibilizados com o soro do próprio doador aumentou a mediana do índice corpuscular de 21,25 para 128,3, aumentou mediana da proporção de monócitos expressando corpúsculos lipídicos de 11,75 para 50 ($p= 0,017$, teste t), mas não influenciou o número de corpúsculos lipídicos expressos por monócitos. (Figura 29).

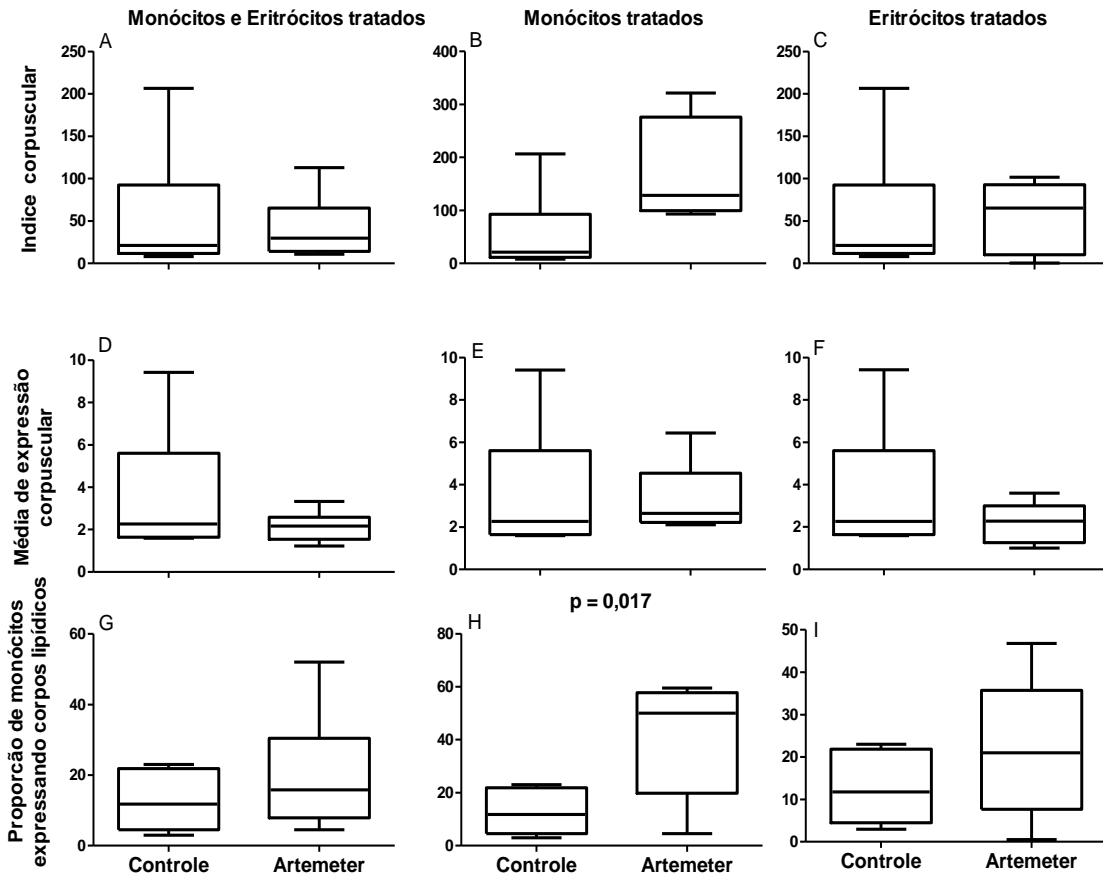


Figura 29. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos e/ou monócitos com artemeter por 60 min sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos estimulados com 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizado com o soro do doador, por escavação. A, B, C - Índice corpuscular; D, E, F - Média de expressão corpuscular por monócitos; G, H, I- Percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos. Em H: Aumentou a mediana do percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos de 11,75 para 50 ($p= 0,017$).

4.5.2.2. Lumefantrina

O tratamento dos eritrócitos e monócitos com lumefantrina, por 60 min quando os eritrócitos foram sensibilizados com o soro do próprio doador aumentou a mediana do índice corpuscular de 21,25 para 92, aumentou

mediana da proporção de monócitos expressando corpúsculos lipídicos de 11,75 para 34 ($p= 0,032$, teste t) mas não influenciou a média de expressão corpuscular. (Figura 30).

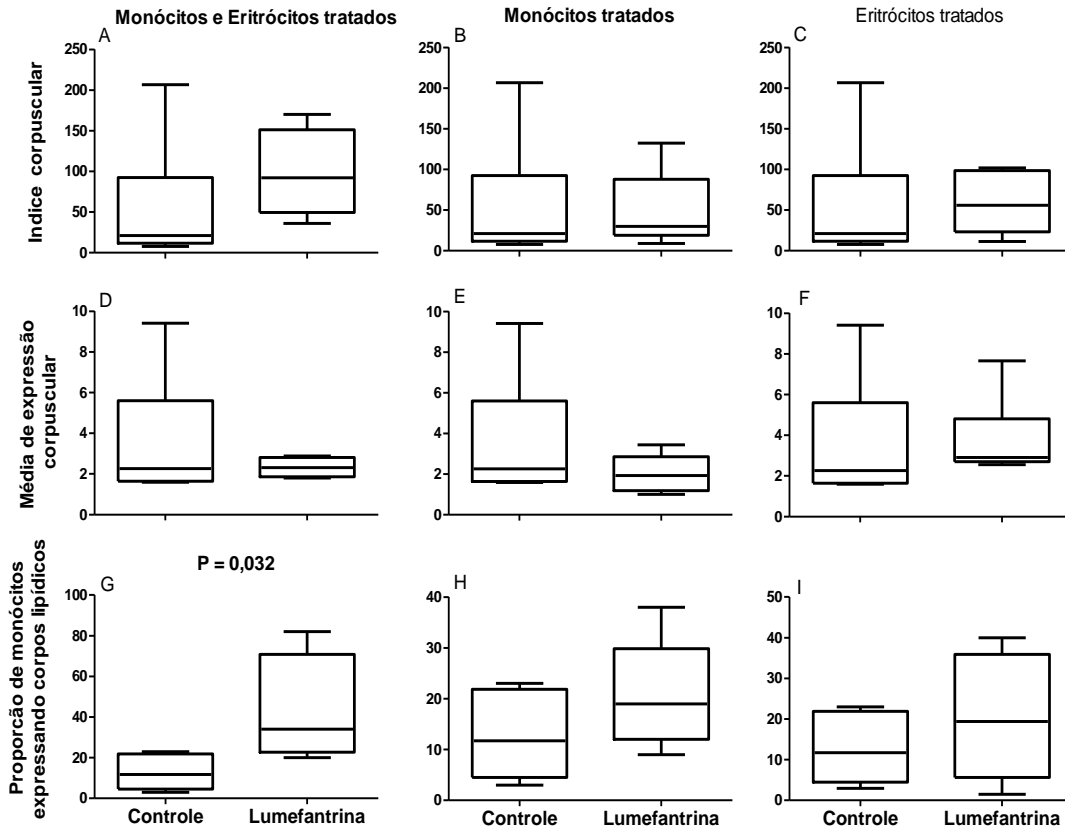


Figura 30. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos e monócitos com lumefantrina por 60 min sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos estimulados com 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizado com o soro do doador por escavação. A, B, C- Índice corpuscular; D, E, F - Média de expressão corpuscular por monócitos; G, H, I- Percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos. Em G: Aumentou a mediana do percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos ($p= 0,032$).

4.5.2.3. Mefloquina

O tratamento dos eritrócitos e monócitos com mefloquina, por 60 min quando os eritrócitos foram sensibilizados com o soro do próprio doador aumentou a mediana do índice corpuscular de 21,25 para 66,5, aumentou mediana da proporção de monócitos expressando corpúsculos lipídicos de 11,75 para 24,8 ($p= 0,032$, teste Mann Whitney), mas não influenciou a média de expressão corpuscular. O tratamento dos eritrócitos isoladamente aumentou a mediana do índice corpuscular de 21,25 para 60,75, aumentou mediana da proporção de monócitos expressando corpúsculos lipídicos de

11,75 para 21,25, ($p= 0,041$, teste t), porém não influenciou a média de expressão corpuscular. (Figura 31).

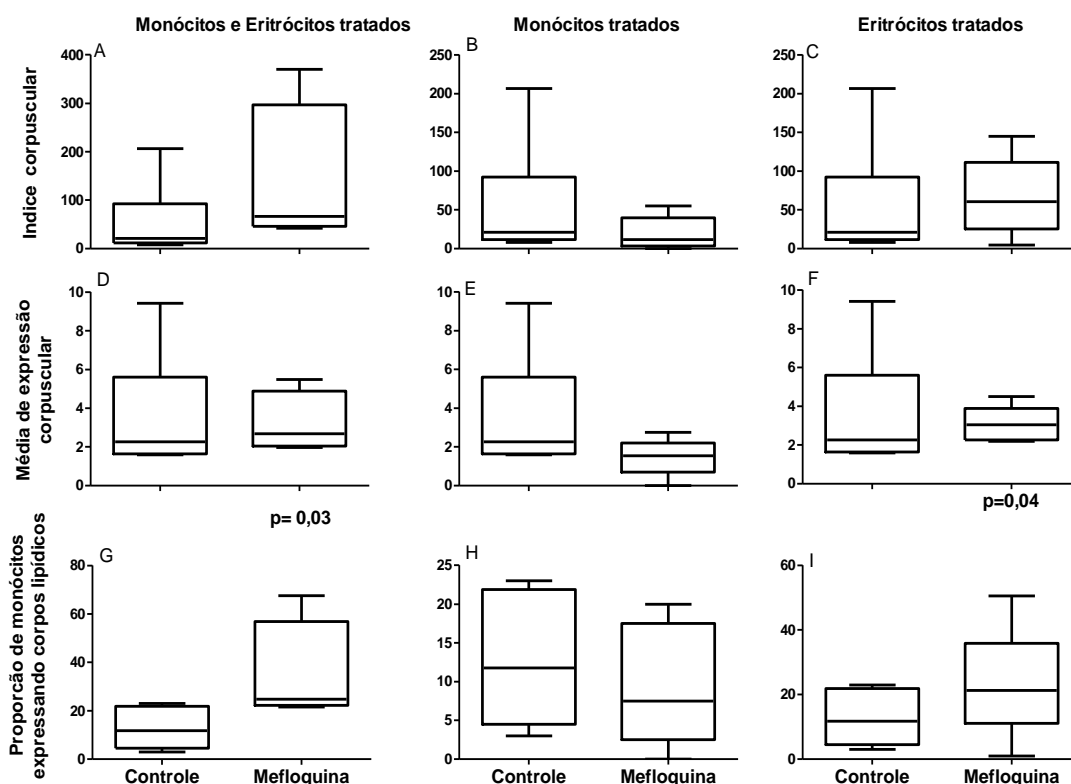


Figura31. Influência do tratamento *in vitro* de eritrócitos e monócitos com mefloquina por 60 min sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos estimulados com 10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* sensibilizado com o soro do doador, por escavação. A, B, C - Índice corpuscular; D, E, F - Média de expressão corpuscular por monócitos; G, H, I- Percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos. Em G: Aumentou a mediana do percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos ($p= 0,032$). Em G: Aumentou a mediana do percentual de monócitos envolvidos na expressão corpuscular de 11,75 para 21,25 valor de $p= 0,041$.

4.6. ÓXIDO NÍTRICO

Influência dos antimaláricos artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a produção de óxido nítrico pelos monócitos de indivíduos normais estimulados ou não com eritrócitos infectados ou não com *P. falciparum*

O óxido nítrico foi determinado para estimar a influência dos antimaláricos artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a capacidade de produção de moléculas reativas intermediárias de nitrogênio pelos monócitos estimulados ou não com eritrócitos infectados ou não com *P. falciparum*. O tratamento com os eritrócitos parasitados não modificou a produção do NO pelos monócitos, como também os antimaláricos artemeter, lumefantrina e

mefloquina (figura 32) não alterou a produção do NO pelos monócitos ($p>0,05$).

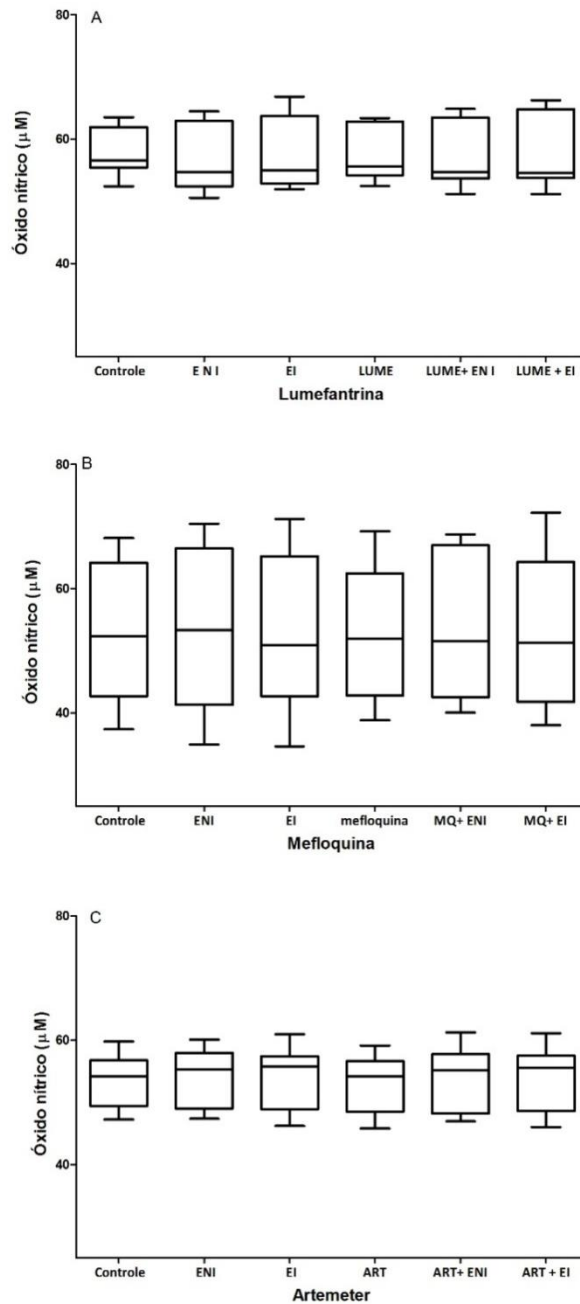


Figura 32. Influência do tratamento *in vitro* monócitos com lumefantrina (A), mefloquina (B) e artemeter (C), por 60 min sobre a produção de NO. Lume = lumefantrina, Mf = mefloquina, Art = artemeter, ENI = eritrócito não infectado, EI = eritrócito infectado. $P>0,05$.

4.7. Influência do artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a produção de peróxido de hidrogênio *in vitro* pelos monócitos de indivíduos normais estimulados ou não com eritrócitos infectados ou não com *P. falciparum*

A produção de peróxido de hidrogênio basal e após estímulo com eritrócitos infectados ou não infectados, *in vitro*, pelos monócitos de indivíduos normais foi avaliada para verificar a influência do tratamento com artemeter, da mefloquina e da lumefantrina por 60min sobre a produção desta molécula reativa de oxigênio.

Observamos que quando os monócitos foram estimulados com os com os eritrócitos infectados pelo *P. falciparum* houve aumento consistente da mediana da concentração do peróxido de hidrogênio (Figura 33. A, B, C). Quando foi feito o tratamento com o lumefantrina (Figura 33A) e com o artemeter (Figura 33C) e os monócitos foram estimulados com os eritrócitos parasitados, persistiu o aumento da concentração do peróxido de hidrogênio. No entanto, quando os monócitos foram estimulados com os eritrócitos normais não parasitados, na presença ou não das drogas, não observamos modificação da produção do peróxido de hidrogênio (Figura 33 A, B). Entretanto, quando os monócitos foram tratados com a mefloquina houve diminuição da produção do peróxido de hidrogênio (Figura 33B) e a droga reverteu o aumento que tinha sido produzido pelos eritrócitos parasitados (Figura 33 B).

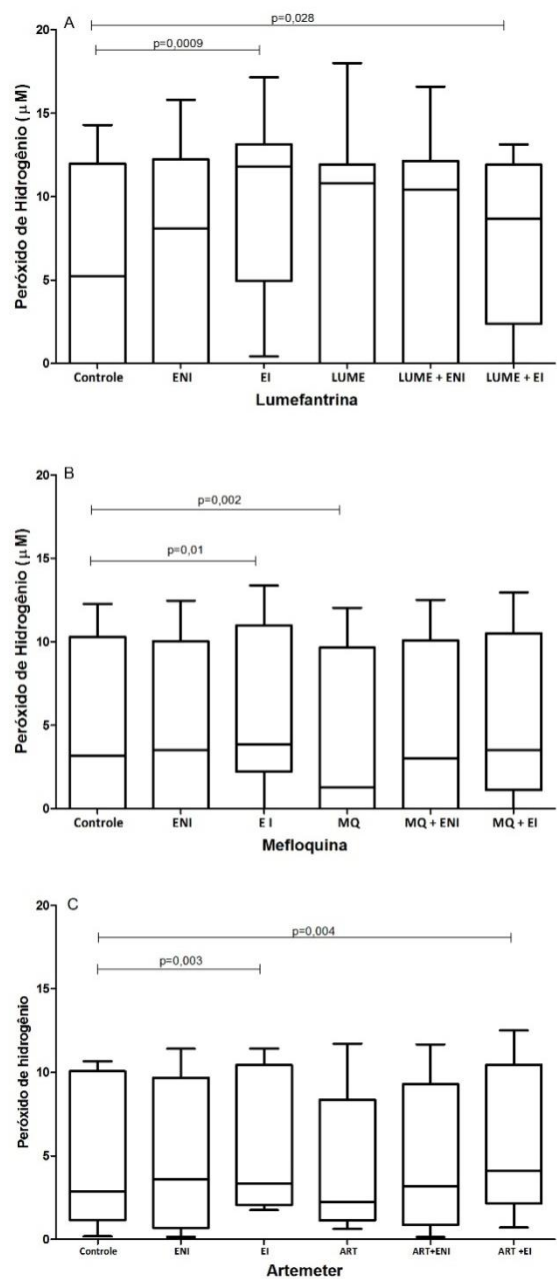


Figura 33. Influência do tratamento *in vitro* monócitos com lumefantrina (A), mefloquina (B) e artemeter (C) por 60 min sobre a produção de H₂O₂. Lume = lumefantrina, Mf = mefloquina, Art = artemeter, ENI = eritrócito não infectado, EI = eritrócito infectado. Em A: EI>Controle (teste Wilcoxon), LUME+EI>Controle (teste Wilcoxon); Em B: EI>Controle (teste Wilcoxon), MF<Controle (teste Wilcoxon); Em C: EI>Controle (teste Wilcoxon), ART+EI>Controle (teste Wilcoxon).

DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram pela primeira vez a influência dos antimaláricos artemeter, lumefantrina e mefloquina sobre a biogênese dos corpúsculos lipídicos. Nós avaliamos a influência dos antimaláricos *in vitro* sobre a produção dos corpúsculos lipídicos, estimulada por eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* não sensibilizados, ocorrendo, portanto, o estímulo dos macrófagos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (rPMPs) e também estimulados com eritrócitos parasitados pelos parasitos previamente sensibilizado com o soro do próprio doador, ocorrendo, portanto, o estímulo dos macrófagos pelos receptores para opsoninas.

Foram feitas três abordagens diferentes: A) Apenas os monócitos foram previamente tratados com os antimaláricos artemeter, mefloquina ou lumefantrina. B) Somente os eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* foram previamente tratados com os antimaláricos. C) Tanto os monócitos quanto os eritrócitos foram tratados previamente com os antimaláricos. Essas abordagens foram feitas com o objetivo de discriminar se as drogas estavam modulando diretamente a função dos monócitos ou se era a ação antiparasitária das drogas lesando o parasito antes de sua interação com o fagócito, modificando portanto o modo de estímulo do monócito, é que determinava as alterações nas repostas dos fagócitos, influenciando, portanto, a produção dos corpúsculos lipídicos.

O tratamento dos eritrócitos infectados e dos monócitos por 60 min com os 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, 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. Borges (2013) mostrou aumento da expressão dos corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneias de camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, e tem sido mostrado, utilizando a infecção de macrófagos com *Mycobacterium bovis*, que o estímulo para produção de corpúsculos lipídicos foi dependente da interiorização das bactérias pelos receptores semelhante ao Toll 2, que é um dos receptores para padrões moleculares de patógenos (D'Avila e cols, 2006). Uma possível explicação para essa diminuição da expressão dos corpúsculos lipídicos pelas drogas observadas nesse trabalho seria a modulação negativa dos receptores para PMP na superfície do monócito.

De acordo com essa hipótese, tem sido mostrado que eritrócitos infectados pelo *Plasmodium falciparum* podem ser interiorizados pelos receptores para CD36, que é um rPMP, e quando ocorre a ingestão por essa via não há produção de moléculas inflamatórias (McGilvray e cols, 2000), e que derivados da artemisinina podem diminuir a citoaderência dos eritrócitos parasitados (Udomsangpetch e cols, 1996), que poderia explicar a menor expressão dos corpúsculos lipídicos pelo tratamento com as drogas. A observação de que a média de partículas expressas por monócitos foi menor quando os monócitos foram tratados com as drogas pode corroborar essa hipótese, sugerindo uma ação das drogas sobre os receptores de superfície do monócito. O fato de que o tratamento apenas dos eritrócitos parasitados, sem submeter os monócitos ao tratamento como artemeter, também diminuiu a expressão dos corpúsculos lipídicos, sugere que o tratamento com o artemeter pode ter modificado também a expressão de moléculas de superfície do parasita, possivelmente expondo na superfície dos eritrócitos parasitados pelo plasmódio antígenos mais frequentemente ligantes nos receptores para PMP, contribuindo para a menor expressão dos corpúsculos lipídicos após o tratamento com o artemeter e também com a lumefantrina ou mefloquina, como por nós observado.

O fato de observarmos maior expressão de corpúsculos lipídicos quando os eritrócitos foram sensibilizados pelo soro humano fresco sugere que a interiorização pelos receptores para complemento pode estimular vias intracelulares que culminam com o estímulo da expressão dos corpúsculos lipídicos e que o tratamento com a lumefantrina ou mefloquina facilitaram a ativação dessas vias estimulatórias intracelulares. Borges (2013) sugere que possivelmente a síntese da proteína reguladora adiposa (ADRP) que é estimulada pela degradação do PPAR- γ , durante o metabolismo lipídico, mobilizando lipídios como triacilglicerol (TAG) e o colesterol no interior do corpúsculo lipídicos (de Assis e cols, 2003; Maya-Monteiro e cols, 2008), possa ser responsável pelo aumento dos corpúsculos lipídicos observados nos macrófagos dos animais CBA, C57BL/6 e BALB/c infectados com *P. berghei* ANKA. Ademais tem sido observado (Palacpac e cols, 2004; Jackson e cols, 2004) que o *Plasmodium falciparum* pode estimular a formação de corpúsculos lipídicos nos eritrócitos parasitados, e Nawabi e cols (2003), notaram um aumento de triacilglicerol na infecção pelo plasmódio.

Segundo D'Avila e cols (2006), a biogênese dos corpúsculos lipídicos é altamente regulada por estímulos específicos e os corpúsculos lipídicos são compostos por um conjunto diverso de enzimas que estão envolvidas na biogênese e catabolismo dos corpúsculos lipídicos (Brasaemle e cols., 1997; Yu e cols., 1998; Tauchi-Sato cols., 2002; Wan e cols., 2007), biossíntese de caveolina e proteínas da família Rab (Pol e cols, 2004), enzimas de formação

de eicosanóides (Pacheco e cols, 2002), proteínas cinases, como a PI3 cinase, MAP cinase e PKC (Yu e cols, 1998). Portanto os corpúsculos lipídicos podem estar envolvidos no tráfego de membrana e na sinalização celular. E, segundo Borges (2013), os eicosanóides, presentes nos corpúsculos lipídicos, possivelmente desempenham um papel importante no desenvolvimento da malária cerebral.

O papel emergente dos corpúsculos lipídicos como organelas inflamatórias eleva o estatus de reguladores críticos de doenças inflamatórias e infecciosas, como marcadores chave de ativação das células. Isso está em conformidade com os dados de Borges (2013), que mostrou expressão aumentada da biogênese dos corpúsculos lipídicos em diferentes modelos murinos infectados pelo plasmódio, tanto em modelos murinos susceptíveis como resistentes à forma cerebral da doença, e demonstrou que a condição inflamatória ocorre tanto em modelo suscetível quanto em modelo resistente à forma cerebral. Portanto, como a aumentada expressão dos corpos lipídicos está envolvida na fisiopatologia da malária grave, como foi mostrado em modelos murinos da malária por Borges (2013), a ação do artemeter diminuindo a expressão total dos corpúsculos lipídicos, como mostrado por nós nesse trabalho, pode ter um papel chave, evitando a imunopatogenia da doença. E que além de seu papel antiparasitário, esse seu papel imunomodulador, pode ser um dos mecanismos pelo qual o artemeter tão eficientemente diminui o risco das formas graves da malária.

Artemisininas e seus derivados podem diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, particularmente o fator de necrose tumoral (FNT). Foi observado que artemisininas e seus derivados podem inibir vias de sinalização em monócitos/macrófagos e podem modular as funções dos monócitos/macrófagos. De especial importância é a modulação da via do NF- κ B, que modula a transcrição de genes relacionados com a produção de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e apoptose (Pahl, 1999). A expressão do mRNA dos receptores do tipo Toll 4 e 9 foi inibida juntamente com a diminuição da ativação de NF- κ B. É possível que tenha sido por modulação dessas vias que o artemeter tenha diminuído a produção dos corpúsculos lipídicos.

Quando analisamos a fagocitose realizada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, nossos resultados mostraram que o tratamento prévio apenas dos monócitos com a lumefantrina, diminuiu a capacidade fagocitária total dos monócitos para o parasito. Como também a de esquizontes, pelo menor envolvimento dos monócitos na fagocitose e menor ingestão de parasitos por monócito.

Os mecanismos pelos quais em nosso trabalho o tratamento *in vitro* dos monócitos com a lumefantrina diminuiu a capacidade fagocitária dos monócitos não estão esclarecidos. Como a lumefantrina diminuiu o número de esquizontes ingeridos por monócito, uma possível explicação é que esse antimalárico possa ter alterado a expressão dos receptores envolvidos na fagocitose dessa forma do parasito. De fato, tem sido mostrado que os eritrócitos infectados se ligam ao receptor CD36 que é expresso em células endoteliais, células epiteliais, macrófagos, monócitos, plaquetas, precursores de eritrócitos e adipócitos (Greenwalt e cols, 1992). Também foi observado que a fagocitose de eritrócitos infectados com *P. falciparum* aumentou significativamente quando foram comparados monócitos frescos com macrófagos amadurecidos em cultura, sendo que os últimos expressam um maior número de moléculas CD36, e quando as células foram tratadas com anticorpo anti-CD36, a fagocitose tanto dos monócitos quanto dos macrófagos foi inibida (McGilvray e cols, 2000), mostrando a importância desse receptor para ingestão dos eritrócitos parasitados.

Vários receptores têm sido implicados na citoaderência dos eritrócitos parasitados nas células endoteliais, incluindo a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), selectina-E (Ockenhouse e cols, 1992), molécula de adesão celular endotelial/plaquetária (PECAM)-1/CD31 (Treutiger e cols., 1997) e CD36 (Patel e cols., 2004), tendo sido observado que os macrófagos de roedores são capazes de interiorizar eritrócitos parasitados não opsonizados. Estudos utilizando macrófagos de camundongos selvagens ou nocautes para a molécula CD36 mostraram que a molécula CD36 é o receptor principal envolvido no processo de fagocitose *in vitro*. Macrófagos de camundongos nocautes para a molécula CD36 apresentaram redução significativa na fagocitose de eritrócitos parasitados, em comparação com a de macrófagos dos camundongos selvagens. A fagocitose pela ligação do parasito na molécula CD36 dos monócitos não induz produção de citocinas pró-inflamatórias (McGilvray e cols, 2000), sugerindo que a ligação ao CD36 pode modular negativamente o processo inflamatório que se encontra exacerbado nas formas graves.

Ademais para a fagocitose acontecer, os monócitos têm que se mover até o eritrócito parasitado pelo plasmódio e fazer a ingestão do mesmo. Uma vez que a diminuição da fagocitose pela lumefantrina ocorreu também pelo menor envolvimento dos monócitos na fagocitose, a possibilidade de que a lumefantrina possa ter também diminuído a mobilidade dos monócitos em relação a este parasita não pode ser excluída. Como a lumefantrina utilizada em nossos experimentos estava associada ao artemeter, não é possível excluir a ação do artemeter no resultado final. Entretanto, como a ação do

artemeter foi exclusivamente sobre as formas em anel e apenas quando os eritrócitos parasitados foram tratados com a droga, e sua ação foi oposta à da lumefantrina, é possível que o resultado observado para a lumefantrina tenha mesmo sido devido à ação da lumefantrina sobre o monócito. Alternativamente, como a dose do artemeter foi menor quando utilizado junto com a lumefantrina, não podemos excluir uma ação diferente da droga quando em menor concentração ou quando em associação da lumefantrina com o artemeter.

Nossos dados mostraram que a mefloquina aumentou apenas a média de hemozoína ingerida por monócito pelos receptores para PMP, quando apenas os eritrócitos foram tratados com a droga. Entretanto, tem sido sugerido que a mefloquina exerce um efeito depressor sobre o sistema imunitário, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (Boulos e cols, 1993) e IL-2 (Landewé e cols, 1995), que estão envolvidas nos passos iniciais da infecção da malária grave (Muniz-Junqueira, 2007). Portanto, não está claro os mecanismos pelos quais a mefloquina aumentou a ingestão da hemozoína em nosso sistema.

Quando a fagocitose foi testada pelos receptores para opsoninas, verificamos que apenas o artemeter diminuiu o índice fagocitário total dos monócitos, quando os monócitos e os eritrócitos parasitados foram tratados pela droga. Pela discriminação das formas do parasito ingeridas, observamos menor fagocitose das formas em hemozoína. Como em nesse trabalho a análise foi feita utilizando eritrócitos sensibilizados com soro do próprio doador, que eram indivíduos não imunes à malária, a ingestão dos eritrócitos parasitados ocorreu principalmente pelos receptores para componentes do sistema do complemento.

Diferentemente dos nossos resultados, alguns autores mostraram que a mefloquina inibiu a fagocitose. Foi observado que a mefloquina e o artemeter diminuíram a defesa contra o parasito pela inibição da fagocitose dos parasitos da malária por monócitos e neutrófilos (Shalmiev e cols, 1996). Essas diferenças foram causadas provavelmente por variações no protocolo de pesquisa, como diferença no tempo de exposição à droga e diferença na concentração do fármaco.

Deve ser enfatizado que em nosso trabalho não foi testada a fagocitose por meio de receptores para a porção Fc da imunoglobulina, por onde ocorre a fagocitose na presença dos anticorpos específicos para o plasmódio, que é um importante mecanismo de defesa antiparasitário quando os indivíduos já são imunes ao plasmódio. A fagocitose mediada por anticorpos é um mecanismo importante da imunidade adquirida, contribuindo para o controle da parasitemia *in vivo*, e tem sido demonstrado que a fagocitose opsônica de merozoítos é mediada por IgG, principalmente anticorpos IgG1 e IgG3

citofílicos para antígenos de superfície de merozoítos, ativando monócitos, com subsequente liberação de citocinas pro-inflamatórias, que aumentam ainda mais a eliminação do parasita *in vivo* (Osier e cols, 2014).

Tem sido mostrado que eritrócitos parasitados podem interagir com os monócitos pelos receptores para complemento. Rowe e cols. (1997) relataram que o ligante do parasita para formação de rosetas em um clone de *P. falciparum* foi a molécula PfEMP1, codificada por um gene específico *var*. O receptor para complemento CR1 é expresso também na superfície de alguns leucócitos (Rowe e cols, 2000). CR1 liga-se aos componentes do complemento C3b e C4b ativados e determina várias funções importantes, incluindo a remoção dos imunocomplexos da circulação pelos eritrócitos e potencializa a fagocitose pelos monócitos (Rowe e cols, 2000).

Tem sido observado que os eritrócitos infectados com parasitos da malária, mesmo quando opsonizados com soro não imune, são avidamente fagocitados pelos macrófagos derivados de monócitos humanos (Turrini e cols, 1992). Este processo envolve a primeira linha de proteção contra a malária em hospedeiros não imunes. Quando o plasmódio se desenvolve no interior do eritrócito ele induz modificações na membrana do eritrócito, incluindo a aglomeração do antígeno banda 3 da superfície do eritrócito. Isso ocasiona a ligação de autoanticorpos à essa região. Esse imunocomplexo estimula a ativação da via alternativa do sistema do complemento, com consequente deposição da fração C3 do complemento, facilitando a fagocitose do eritrócito parasitado por essa via (Shalmiev e cols., 1996). Tem sido mostrado que o tratamento de monócitos com artemeter e mefloquina reduziu a ligação de IgG às células infectadas (Shalmiev e cols., 1996), e uma vez que esta ligação é necessária para a ativação do complemento (Lutz, 1987), é provável que a ligação de C3 à membrana dos eritrócitos foi também reduzida pelo tratamento com os antimaláricos. Essa menor expressão dos componentes do complemento pode explicar a menor capacidade fagocitária pelos receptores para opsoninas que observamos quando os monócitos e eritrócitos foram tratados pelo artemeter.

Em relação ao NO, nos nossos resultados mostraram que os antimaláricos artemeter, lumefantrina ou mefloquina não alteraram a produção desse radical livre pelos monócitos quando as células foram tratadas por 60min e estimuladas com eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum*. Após estimulação dos monócitos com os eritrócitos infectados pelo *Plasmodium falciparum* também não houve alteração na produção do óxido nítrico pelos monócitos *in vitro*.

Konkimalla et al. (2008) mostraram que a artemisinina e cinco de sua derivados foram capazes de inibir da produção do óxido nítrico na linhagem de macrófago tumoral RAW 264.7 estimulado por LPS e interferon- γ *in vitro*.

Pela análise de microarranjos esses autores mostraram a expressão de 36 genes relacionados à sinalização e ao metabolismo do óxido nítrico após exposição dos macrófagos de linhagem tumoral *in vitro* ao artesunato.

É possível que o tempo de incubação com a droga e a dose por nós utilizada nesse trabalho não tenha sido suficiente para modular a produção do óxido nítrico pelos monócitos estimulados com o *Plasmodium falciparum*.

Nossos dados mostraram que após a incubação dos eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum* com os monócitos, houve aumento da produção do peróxido de hidrogênio por esses fagócitos. Como o peróxido de hidrogênio faz parte do arsenal microbida do monócito para o plasmódio. Nossos dados sugerem que o próprio parasita induz mecanismos microbicidas e esses mecanismos devem ser importantes para a contenção da infecção pela redução da carga parasitária.

As drogas antiparasitárias estudadas apresentaram ação diferenciada na produção desse radical de oxigênio. A incubação dos monócitos com a mefloquina, na ausência do parasito, diminuiu a produção do peróxido de hidrogênio pelos monócitos. Entretanto, quando os eritrócitos parasitados foram adicionados às culturas dos monócitos juntamente com a mefloquina, não houve alteração da produção do peróxido de hidrogênio em relação ao controle incubado apenas com os eritrócitos não parasitados. Isso sugere que o efeito inibitório da mefloquina equilibrou o efeito estimulatório dos eritrócitos parasitados, não havendo modificação na produção total desse radical de oxigênio pelos monócitos.

Entretanto, o artemeter e a lumefantrina não foram capazes de equilibrar a produção desse radical livre quando os monócitos foram estimulados com os eritrócitos parasitados, ocorrendo aumentada produção do H₂O₂ em cultura, mas que possivelmente foi determinada pelo estímulo com os eritrócitos parasitados, pois as drogas isodamente não foram capazes de modificar a produção do peróxido de hidrogênio pelos monócitos em cultura na ausência do estímulo com os eritrócitos parasitados. As implicações para a evolução da doença da modulação negativa pela mefloquina da produção peróxido de hidrogênio pelos monócitos não está ainda esclarecida. Pois, tem sido observado que essas moléculas fazem parte da defesa antiparasitária pelos monócitos, entretanto, sua produção exacerbada tem sido relacionada com a imunopatogenia das formas graves da malária. Observamos que parasito estimulou a produção do peróxido de hidrogênio, entretanto tem sido referido que o aumento de H₂O₂ pode ter contribuído para o desenvolvimento da malária cerebral em camundongos C57BL/6, após a infecção pelo *Plasmodium berghei*, por ativar a produção de mediadores inflamatórios, atuando na via de sinalização do NFκ-B e na via STAT (Borges, 2013; Park e cols., 2011). Em seres humanos a infecção malárica está

associada com um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelas células fagocíticas, sugerindo que estas moléculas participam nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o parasita (Muniz- Junqueira, 2007). Porém, em pacientes com malária grave houve aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, em concordância com outros estudos que demonstraram que o aumento de espécies reativas de oxigênio poderia ser responsável pelo dano tecidual nas formas grave da malária (Muniz-Junqueira, 2007). Portanto, esses aspectos ainda são controversos.

Diferente de nossos resultados, foi observado que o artemeter aumentou a produção dos radicais de oxigênio por células esplênicas de camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com a droga (Prada e cols., 1996). A diferença observada em relação aos nossos dados pode ter sido devida ao diferente tipo de célula e hospedeiro avaliados. Isso mostra que o tipo de resposta pode ser diferente segundo a célula estudada. Também tem sido considerado que dependendo do local e da quantidade produzida, as espécies reativas de oxigênio podem ter um efeito protetor ou participar dos mecanismos imunopatogênicos da doença (Becker e cols, 2004; Muniz-Junqueira, 2007).

Uma possível limitação do nosso trabalho foi o fato de termos avaliado a influências das drogas *in vitro* e não no paciente em tratamento para infecção pelo plasmódio. Entretanto, pela avaliação da ação dos antiplasmodiais no próprio indivíduo infectado não seria possível excluir os vieses da influência da própria infecção pelo plasmódio, o que alteraria as funções do sistema imunitário pela produção das citocinas, e que poderiam influenciar o resultado final da ação desses fármacos.

Em conclusão, nossos dados mostraram pela primeira vez a influência dos três antimaláricos estudados sobre a expressão de corpúsculos lipídicos, diminuindo a expressão de corpúsculos lipídicos quando o estímulo foi feito com o parasito não sensibilizado, cuja ingestão pelo monócito ocorreu pelos receptores para padrões moleculares de patógenos. Entretanto, a lumefantrina e a mefloquina aumentaram a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos estimulados com eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* pelos receptores para complemento, indicando que a expressão dos corpúsculos lipídicos foi dependente da via pelo qual o monócito foi estimulado pelo eritrócito parasitado. Esses dados sugerem que o tratamento com mefloquina e lumefantrina dos eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* sensibilizados podem ativar vias estimulatórias intracelulares que são dependentes do receptor pelo qual o parasito sensibilizado foi interiorizado e que culmina com a aumentada expressão dos corpúsculos lipídicos pelos monócitos.

A lumefantrina deprimiu a fagocitose dos eritrócitos parasitados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, enquanto a depressão da fagocitose ocasionada pelo artemeter foi dependente da ingestão do parasito pelos receptores para complemento.

A infecção pelo *P. falciparum* estimulou a produção do peróxido de hidrogênio pelos monócitos e apenas a mefloquina foi capaz de equilibrar esse efeito estimulatório dos eritrócitos parasitados.

Nossos dados mostraram que o artemeter, a lumefantrina e a mefloquina modulam as respostas dos monócitos aos eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum* em aspectos fundamentais relacionados com a defesa inata, nas interações iniciais do parasito com as células de defesa do hospedeiro. Mostrando, portanto, que a ação desses fármacos não depende exclusivamente de sua atividade antiparasitária, mas que o resultado final da ação dessas medicamentos depende também da modulação dos diversos mecanismos de defesa inato contra o parasito.

A ação desses fármacos modulando as respostas das células de defesa do hospedeiro ao parasito pode ser importante na infecção pelo plasmódio, pois tem sido descrito que a resposta exacerbada do sistema imunitário esta envolvida na imunopatogenia da malária grave. Dessa forma a ação imunomoduladora desses fármacos podem colaborar para diminuir a gravidade na infecção pelo plasmódio por sua ação imunomoduladora.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos com esse trabalho mostram que as drogas antiparasitárias estudadas modulam as funções dos monócitos, e podem influenciar diferentemente a capacidade fagocitária, a expressão de corpúsculos lipídicos e a capacidade de produção de radicais de oxigênio e nitrogênio.

Em relação ao artemeter, podemos concluir que:

1) Em relação à fagocitose:

O artemeter diminuiu o índice fagocitário total dos monócitos quando avaliado pelos receptores para opsoninas e para hemozoína, quando tratados monócitos e eritrócitos infectados.

O artemeter aumentou o índice fagocitário dos monócitos e o percentual de monócitos envolvidos na fagocitose de parasitos na forma de anel, quando avaliado pelos receptores para PMP e dos eritrócitos infectados com *P. falciparum* foram tratados com a droga.

2) Em relação à expressão de corpúsculos lipídicos:

O artemeter diminuiu a expressão de corpúsculos lipídicos nos monócitos, detectado pela diminuição do índice corpuscular e pelo menor número de corpúsculos por monócito, quando os monócitos e eritrócitos foram tratados com a droga e estimulados pelos eritrócitos não sensibilizados. Como também diminuiu a expressão dos corpúsculos lipídicos quando apenas os eritrócitos parasitados foram tratados pela droga.

Observou-se resultado oposto, com aumento da expressão dos corpúsculos lipídicos, quando apenas os monócitos foram tratados com o artemeter e foram estimulados pelos receptores para opsoninas pelos eritrócitos parasitados sensibilizados pelo soro fresco.

3) Em relação à produção de radicais de oxigênio e nitrogênio.

O artemeter não modificou a produção dos radicais de oxigênio e nitrogênio.

O estímulo do monócito pelo rPMP com parasito possivelmente tendo sofrido pela ação do artemeter não estimulou a expressão dos corpúsculos lipídicos, mas quando o estímulo foi feito com o parasito vivo (eritrócitos não tinham sido tratados pelo artemeter) - e pelo receptor para complemento- aumentou a expressão dos corpúsculos lipídicos- isso mostra dependendo da via que ocorre o estímulo do monócito vai ou não estimular a expressão dos corpúsculos lipídicos – como também a estimulação dos corpúsculos lipídicos é influenciada pela viabilidade do parasito.

Em relação à lumefantrina, podemos concluir que:

1) Em relação à fagocitose:

A lumefantrina diminuiu o índice fagocitário total e o percentual de monócitos envolvidos na fagocitose, quando apenas os monócitos foram tratados com a droga e fagocitose foi avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos

Na fagocitose avaliada pelos receptores para opsoninas, a lumefantrina diminuiu a média de esquizontes fagocitados quando os eritrócitos foram tratados isoladamente.

2) Em relação à expressão de corpúsculos lipídicos:

A lumefantrina diminuiu o índice corpuscular e o percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos quando os eritrócitos e/ou monócitos foram tratados, e os monócitos foram estimulados pelos eritrócitos parasitados não sensibilizados, pelos receptores para PMP.

Quando os monócitos foram estimulados pelos receptores para opsoninas, a lumefantrina aumentou o índice corpuscular e o percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos, quando monócitos e eritrócitos foram tratados com a lumefantrina.

3) Em relação à produção de radicais de oxigênio e nitrogênio.

A lumefantrina não modificou a produção dos radicais de oxigênio e nitrogênio

Em relação à mefloquina, podemos concluir que:

1) Em relação à fagocitose:

Na fagocitose por receptores para padrões moleculares para patógenos a mefloquina aumentou a média de hemozoína fagocitada.

2) Em relação à expressão de corpúsculos lipídicos:

A mefloquina diminuiu o índice corpuscular quando eritrócitos e/ou monócitos foram tratados, o percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos e o número de corpúsculos por monócito quando estimulados com os eritrócitos parasitados tratados e não sensibilizados.

Quando os monócitos foram estimulados pelos receptores para opsoninas, a mefloquina aumentou a expressão dos corpúsculos lipídicos e o percentual de monócitos expressando corpúsculos lipídicos, quando os eritrócitos e/ou monócitos foram tratados.

3) Em relação à produção de radicais de oxigênio e nitrogênio.

O tratamento dos monócitos com mefloquina diminuiu a produção de peróxido de hidrogênio.

Nossos dados sugerem ação das drogas tanto sobre os monócitos deprimindo sua capacidade fagocitária, quanto sobre os eritrócitos parasitados. Nesse último caso, é possível que as alterações da viabilidade dos parasitas tenha facilitado a fagocitose pelos monócitos. Como in vivo a droga atua tanto sobre o parasita quanto sobre o monócito, é provável que tanto a ação sobre o parasita, quanto a modulação negativa da função fagocitária deve estar contribuindo para diminuir a morbidade pelas formas graves da doença, que está relacionada com a hiperativação dos fagócitos.

O resumo das conclusões encontra-se na tabela 1

Teste	Fármaco					Artemeter			Lumefantrina			Mefloquina		
	Células tratadas					M+E	M	E	M+E	M	E	M+E	M	E
Fagocitose geral (rPMP)	IF					=	=	=	=	↓	=	=	=	=
	Média					=	=	=	=	=	=	=	=	
	%					=	=	=	=	↓	=	=	=	
Fagocitose geral (Opsoninas)	IF					↓	=	=	=	=	=	=	=	
	Média					=	=	=	=	=	=	=	=	
	%					=	=	=	=	=	=	=	=	
Fagocitose de hemozoína (rPMP)	IF					=	=	=	=	=	=	=	=	
	Média					=	=	=	=	=	=	=	↑	
	%					=	=	=	=	=	=	=	=	
Fagocitose hemozoína (Opsoninas)	IF					↓	=	=	=	=	=	=	=	
	Média					=	=	=	=	=	=	=	=	
	%					=	=	=	=	=	=	=	=	
Fagocitose de esquizonte (rPMP)	IF					=	=	=	=	↓	=	=	=	
	Média					=	=	=	=	↓	=	=	=	
	%					=	=	=	=	↓	=	=	=	
Fagocitose de esquizonte (Opsonina)	IF					=	=	=	=	=	=	=	=	
	Média					=	=	=	=	=	=	=	=	
	%					=	=	=	=	=	=	=	=	
Fagocitose do plasmódio na forma de anel (rPMP)	IF					=	=	↑	=	=	=	=	=	
	Média					=	=	=	=	=	=	=	=	
	%					=	=	↑	=	=	=	=	=	
Fagocitose do plasmódio na forma de anel (Opsonina)	IF					=	=	=	=	=	=	=	=	
	Média					=	=	=	=	=	=	=	=	
	%					=	=	=	=	=	=	=	=	
Expressão de corpos lipídicos(rPMP)	IC					↓	=	↓	=	↓	=	=	=	
	Média					↓	=	↓	↓	=	↓	=	↓	
	%					=	=	↓	=	↓	=	=	=	
Expressão de corpos lipídicos (Opsoninas)	IC					=	=	=	=	=	=	=	=	
	Média					=	=	=	=	=	=	=	=	
	%					=	↑	=	↑	=	=	↑	↑	
	EN I	E I	ART	ART+E NI	ART +EI	LUM	LUM+ENI	LUM+EI	M Q	MQ+E NI	MQ + EI			
NO	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	
H ₂ O ₂	=	↑	=	=	↑	=	=	↑	↓	=	=	=	=	

rPMP = a receptores para padrões moleculares para patógenos; IF= índice fagocitário; % = percentual de monócitos envolvidos; IC= índice corpuscular; M= monócito; E= eritrócito; ENI= eritrócito não infectado; EI= eritrócito infectado;ART= artemeter; LUME = lumefantrina; MQ= mefloquina; ↓= diminuiu; ↑ aumentou; = não alterou.

REFERÊNCIAS

Abbas, A.K; Lichtman, A. H.; Pillai, S; *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 7ªEdição; 2011.

Aguiar, A. C. C. Avaliação da Atividade Citotóxica e Antimalárica de Análogos da Cloroquina. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.

Ali, S.; Najmi, M. H.; Tarning, J.; Lindegardh, N. Pharmacokinetics of artemether and dihydroartemisinin in healthy Pakistani male volunteers treated with artemether-lumefantrine. *Malar J*, 275; 2010.

Anfosso, L.; Efferth, T.; Albini, A.; Pfeffer, U. Microarray expression profiles of angiogenesis-related genes predict tumor cell response to artemisinins. *Pharmacog J*, 6, 269–278; 2006.

Antonelli, L. R.; Leoratti, F. M.; Costa, P. A.; Rocha, B. C.; Diniz, S. Q.; Tada, M. S.; Pereira, D. B.; Teixeira-Carvalho, A. ; Golenbock, D. T.; Gonçalves, R.; Gazzinelli, R. T. The CD14.CD16.inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Pat*; 2014.

Artavanis-Tsakonas, K. ; Riley, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- γ from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*, 169, 2956–2963 2002.

Baird, J.K.; Surjadjaja, C. Consideration of ethics in primaquine therapy against malaria transmission. *Trends Parasitol*, 11-6; 2011.

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

Billig, E. M.; Philip, G.; McQueen; McKenzie, E. F. Foetal haemoglobin and the dynamics of paediatric malaria. *Malar J*, 396; 2012.

Bousema ,T.; Drakeley, C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria *Clin Microbiol Ver*, 24:377-410; 2011.

Borges, T. K. S. Mecanismos de Resposta Inflamatória em Modelos Murinos de *Plasmodium berghei* ANKA, Suscetíveis ou não à Malária Cerebral. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília; 2013.

Boulos, M.; Costa, J. M.; Tosta, C. E. Comprometimento pulmonar na malária (revisão). Rev Inst Med Trop, 35, 93-102; 1993.

Brasaemle, D.L.; Barber, T.; Wolins, N.E.; Serrero, G.; Blanchette-Mackie, E.J.; Londos, C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. J Lipid Res, 38, 2249–63; 1997.

Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Portaria n.º 355/2000/FUNASA. Comitê de Acompanhamento Técnico do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1; 2000.

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.

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. Acessado em 07/06/2015

Centers for Disease Control and Prevention. 2015. Malaria. <http://www.cdc.gov/malaria> (acessado em 07/06/2015).

Clark, I.A. ; Cowden, W. B. The Pathophysiology of falciparum malária. Pharmacol, 99, 221-260; 2003.

Cowman, A.F.; Crab, B.S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. Cell, 755-766; 2006.

D'Avila, H.; Melo, R. C.; Parreira, G. G.; Werneck-Barroso, E.; Castro-Faria-Neto, H. C.; Bozza, P. T. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. J Immunol, 176, 3087-97; 2006.

de Assis, E.F. e cols. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferators-activated receptor α agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol*, 171, 2090–2098; 2003.

Delfino, R. T.; Santos-Filho, O. A.; Figueroa Villar, J. D.; J. Braz. Type 2 Antifolates in the Chemotherapy of falciparum Malaria. *J Braz Chem Soc*, 6, 727-741; 2002.

Djimdé, A; Lefèvre, G. Understanding the pharmacokinetics of Coartem®. *Malar J*, 20 8, 1-8; 2009.

Duarte, C.S. Estudos de QSAR-2D em quinolina metanol com atividade antimalárica frente ao *Plasmodium falciparum*. Dissertação. 2012.

Eastman, R.T.; Fidock ,D.A. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat rev Microbiol*, 712,864-874;2009.

França, T. C. C.; Santos, M. G.; Figueroa-Villar, J. D. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. *Quim Nov*, 1271-1278; 2008.

Franklin, B. S.; Rodrigues, S. O.; Antonelli, L. R.; Oliveira, R. V.; Goncalves, A. M.; Sales-Junior, P. A.; Valente, E. P.; Alvarez-Leite, J. I.; Ropert, C.;Golenbock; D.T.; Gazzinelli; R.T. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes Infect*, 9, 881-90; 2007.

Franklin, B.S.; Parroche, P.; Ataíde, M.A.; Lauw, F.; Ropert, C.; de Oliveira, R.B.; Pereira, D.; Tada, M.S.; Nogueira, P.; da Silva, L.H.P. et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon- γ induced enhancement of Toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad*, 106, 5789–5794. 2009.

Friedman, M. J. Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc Nat Acad Scis*, 75,1994-1997; 1978.

Gazzinelli, R. T.; Kalantari, P.; Fitzgerald,K. A. ; Golenbock, D. T. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol*, 14, 744–757; 2014.

Go, M.; Li, Q. Interaction of the antimalarial agents halofantrine and lumafantrina with lipid bilayers. *Chem, Pharmaceut*, 51, 241-246; 2003.

Goldring, J.P.; Dean.; Nemaorani, S. Antimalarial drugs modulate the expression of monocyte receptors. *Int j immunophar*, 599-607 ;1999.

Golenser, J.; Waknine, J.H.;Krugliak, M.; Hunt, N.H.;Grau, G.E. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinin. *Int J Parasitol*, 36,1427–1441; 2006.

Gowda, N. M.; Wu, X.; Gowda, D. C. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *J. Immunol.* 188, 5073–5085; 2012.

Green, L. C.; De Luzuriaga, K. R.; Wagner, D. A.; Rand, W.; Istfan, N.; Young, V. R.; Tannenbaum, S. R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci*, 78, 7764-7768; 1981.

Greenwalt, D. E., Lipsky, R. H., Ockenhouse, C. F., Ikeda, H., Tandon, N. N. and Jamieson, G. A. Membrane glycoprotein CD36: A review of its roles in adherence, signal transduction and transfusion medicine. *Blood*, 80, 1105-1115; 1992.

Gupta, S.; Snow, R.W.; Donnelly, C.A.;Marsh, K.; Newbold, C. Immunity to noncerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med* 5, 340–343; 1999.

Hommel, I.M. The future of artemisinins: natural, synthetic or recombinant? *J Biol*, 7, 38; 2008.

Ing, R.; Segura, M.; Thawani, N.; Tam, M.; Stevenson, M. M. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J Immunol*, 176, 441–450; 2006.

Jackson, K. E.; Klonis, N.; Ferguson, D. J.; 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.

Kokwaro, G.; Mwai, L.; Nzila, A. Artemether/lumefantrine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria. *Exp Opin on Pharmacother*, 75–94; 2007.

Konkimalla, V.B.; Blunder, M.; Korn, B.; Soomro, S.A.; Jansen, H.; Chang, W.; Posner, G.H.; Bauer, R.; Efferth, T. Effect of artemisinins and other endoperoxides on nitric oxide-related signalling pathway in RAW 264.7 mouse macrophage cells. *Nit Ox*, 19, 184–191; 2008.

LaMonte, G.; Philip, N.; Reardon, J.; Lacsina, J.R.; Majoros, W.; Chapman, L.; Thornburg, C.D.; Telen, M.J.; Ohler, U.; Nicchitta, C.V.; Haystead, T.; Chi, J.T. Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into *Plasmodium falciparum* inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. *Cell Host Microb*, 12, 187–199; 2012.

Landewe, R.B.M.; Miltenburg, A.M.M.; Verndonk, M.J.A. e cols. Chloroquine inhibits T- cell proliferation by interfering with IL-2 production and responsiveness. *Clin Exp Immunol*, 102, 144-51; 1995.

Lapouble, O.M.M. Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia Brasileira entre 2003 e 2012. Dissertação de Mestrado, Medicina Tropical Universidade de Brasília, Brasília; 2014.

Lee, K-S.; Divis, P.C.S.; Zakaria, S.K.; Matusop, A.; Julin, R.A. e cols. *Plasmodium knowlesi*: Reservoir Hosts and Tracking the Emergence in Humans and Macaques. *PLoS Pathog*, 7; 2011.

Lutz, H.U.; Bussolino, F.; Flepp, R. e cols. Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proc Nat Acad Scies*, 84, 7368-7372; 1987.

Maya-Monteiro, C. M.; Almeida, P. E.; D'Avila, H.; Martins, A. S.; Rezende, A. P.; Castro-Faria-Neto, H. Bozza, P. T. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 283, 2203-10; 2008.

McGilvray, I. D.; Serghides, L.; Kapus, A.; Rotstein, O. D.; Kain, K. C. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood*, 96, 3231-40; 2000.

Miller, L.H.; Dvorak, J.A.; Shiroishi, T.; Durocher, J.R. Influence of erythrocyte membrane components on malaria merozoite invasion. *J Exp Med*, 138, 1597-1601; 1973.

Miller, J.M. e cols. Malaria, intestinal parasites, and schistosomiasis among Barawan Somali refugees resettling to the United States: a strategy to reduce morbidity and decrease the risk of imported infections. *J Trop Med Hyg*, 62, 115–121; 2000.

Miller, L. H.; Baruch, D. I.; Marsh, K.; Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nat*, 415, 673-679; 2002.

Miller, J. L.; Sack, B. K.; Baldwin, M.; Vaughan, A. M.; Kappe, S. H. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell Rep*, 7, 436–447; 2014.

Ministério da Saúde. Malária. 2014
http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=10933&Itemid=646 (acessado em 08/06/2015).

Mueller, I.; Galinski, M. R.; Baird, J. K.; Carlton, J. M.; Kochar, D.K.; Alonso, P. L.; Porfilho, H. A. D. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lanc Infect*, 555-566; 2009.

Muniz-Junqueira, M. I.; dos Santos-Neto, L.L.; Tosta, C. E. 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.

Muniz-Junqueira, M.I.; Silva, F.O.; Paula-Júnior, M.R.; Tosta CE. Thalidomide influences the function of macrophages and increases the survival of *Plasmodium berghei*-infected CBA mice. *Acta Trop*, 94, 128-38; 2005.

Muniz-Junqueira, M. I.; Tosta, C. E. The pathological bases of immunomodulatory therapy in malaria. *Antibio*, 9, 164-172; 2007.

Muniz-Junqueira, M. I.; Tosta, C. E. Stages of *in vitro* phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by human monocytes. *Rev Soc Bras Med Trop*, 103-106; 2009.

Nawabi, P.; Lykidis, A. Ji. D.; Haldar K. Neutral-lipid analysis reveals elevation of acylglycerols and lack of cholesterol esters in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Euk Cell, 1128-31; 2003.

Ockenhouse, C.F.; Tegoshi, T.; Maeno, Y. e cols. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*, 176,1183–9; 1992.

Oliveira-Ferreira, J.; Lacerda, M.V.G.; Brasil, P.; Ladislau, J.L.B.; Tauil, P.L.; Daniel-Ribeiro, C.T. Malaria in Brazil: an overview. *Mal J*, 9,115; 2010.

Osier, F.H.; Feng, G.; Boyle, M.J.; Langer, C.; Zhou, J.; Richards, J.S.; McCallum, F.J.; Reiling, L.; Jaworowski, A. Anders RF, Marsh K, Beeson JG. Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med*, 12,108; 2014.

Owusu-Agyei, S.; Koram, K. A.; Baird, J. K.; Utz, G. C.; Binka, F. N.; Nkrumah, F. K.; Fryauff, D. J.; Hoffman, S. L. Incidence of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection following curative therapy in adult residents of northern Ghana. *J Trop Med Hyg*, 65, 197–203;2001.

Pacheco, P.; Bozza, F. A.; Gomes, R. N.; Bozza, M.; Weller, P. F.; Castro-Faria-Neto, H. C.; Bozza, P. T. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol*, 169, 6498-6506; 2002.

Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Onc, 18,6853-66; 1999.

Palacpac, N. M.; Hiramine, 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, 117,1469-80; 2004.

Park, S. Y.; Bae, J. U.; Hong, K. W.; Kim, C. D. HO-1 induced by cilostazol protects against TNF- α -associated cytotoxicity via a PPAR- γ -dependent pathway in human endothelial cells. *J Phy Pharmacol*, 15, 83-88; 2011.

Patel, S. N.; Serghides, L.; Smith, T. G.; Febbraio, M.; Silverstein, R. L.; Kurtz, T.W.; Pravenec, M.; Kain, K. C. CD36 mediates the phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by rodent macrophages. J Infect, 189,204-13; 2004.

Perlmann, P.; Troye-Blomberg, M. Malaria and the immune system in humans. *Chem. Immunol*, 80, 229–242; 2002.

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

Pinheiro, P. N. Q.; Peniche, J. S. R.; Schalche, T. R.; Ferreira, M. É. S.; Campos, A. R. F. Pharmacological Aspects of Antimalarial Lumefantrine. *Bvs br/upload*, 3532; 2012

Plebanski, M.; Hill, A. V. The immunology of malaria infection. *Cur opin immunol*, 12, 437-441; 2000.

Pol, A.; Martin, S. Fernandez, M.A.; Ferguson, C.; Carozzi, A. Luetterforst, R. e cols. Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol Biol Cell*,15, 99–110; 2004.

Prada, J.; Müller, S.; Bienzle, U.; Kremsner, P. G. Upregulation of reactive oxygen and nitrogen intermediates in *Plasmodium berghei* infected mice after rescue therapy with chloroquine or artemether. *J Antimicrob Chemother*, 38, 95-102; 1996.

Robert, A.; Benoit-Vical, F.; Dechy-Cabaret, O.; Meunier, B. From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. *Pure Appl. Chem*, 73, 1173; 2001.

Rowe, J. A.; Moulds, J. M.; Newbold, C. I.; Miller, L. H.. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nat*, 388, 292-295; 1997.

Rowe, J.A.; Rogerson, S.J.; Raza, A.; Moulds, M.D. K.; Marsh,K.;Newbold, C. I.; Atkinson, J.P.; Miller, L.H. Mapping of the Region of Complement Receptor (CR) 1 Required for *Plasmodium falciparum* Rosetting and Demonstration of

the Importance of CR1 in Rosetting in Field Isolates. *J Immunol*,165,6341-6346; 2000.

Serviço de Vigilância em saúde (SVS), situação Epidemiológica da malária no Brasil, 2014. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal>. Acessado em 09/ 06/ 2015.

Serviço de Vigilância em Saúde (SVS). Situação Epidemiológica da malária no Brasil, 2013 <http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim-epidemiologico-numero-1-2013>. Acessado em 09/ 06/ 2015.

Shalmiev, G.; Krugliak, M.; Turrini, F.; Ginsburg, H. Antimalarial drugs inhibit the phagocytosis of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90, 558-62; 1996.

Sharma, S.; DeOliveira, R. B.; Kalantari, P.; Parroche, P.; Goutagny, N.; Jiang, Z.; Chan, J.; Bartholomeu, D. C.; Lauw, F.; Hall, J. P.; Barber, G. N.; Gazzinelli, R.T.; Fitzgerald, K. A.; Golenbock, D. T. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immu*, 35, 194–207; 2011.

Silva, T. H. A.; Oliveira, M. T.; Santos, H. F.; Oliveira, A. B.; Almeida, W. B. Molecular modeling study of complexes between ferriprotoporphyrin IX and antimalarial 4-quinolinecarbinolamines: a proposal of pharmacophore. *Quim N*, 28, 244; 2005.

Sponaas, A. M.; Freitas do Rosario, A. P.; Voisine, C.; Mastelic, B.; Thompson, J.; Koernig, S.; Jarra, W.; Renia, L.; Mauduit, M.; Potocnik, A. J.; Langhorne, J. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Bl*, 114, 5522–5531; 2009.

Sullivan, D. J. Jr.; Matile, H.; Ridley, R. G.; Goldberg, D. E. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *J Biol Chem*, 273, 31103-7; 1998.

Sullivan, D. J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int. J. Parasitol*, 32,1645-1653; 2002.

Tabanez, P. C. R. Influencia da Talidomida sobre a infecção Murina por *Plasmodium berghei* ANKA em modelos susceptíveis ou não à malária

cerebral. Dissertação de Mestrado. Patologia Molecular da Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília; 2006.

Tauchi-Sato, K.; Ozeki, S.; Houjou, T.; Taguchi, R.; Fujimoto, T. The surface of lipid droplets is a phospholipidmonolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem*, 277, 44507–12; 2002.

Theander, T.G. Defense mechanisms and immune evasion in the interplay between the human immune system and *Plasmodium falciparum*. *D Med Bull*, 39, 49-63; 1991.

Torgler, R.; Bongfen, S. E.; Romero, J. C.; Tardivel, A.; Thome, M.; Corradin, G.

Sporozoite-mediated hepatocyte wounding limits *Plasmodium* parasite development via MyD88-mediated NF- κ B activation and inducible NO synthase expression. *J Immunol*, 180, 3990–3999; 2008.

Tosta, C.E. Effects of the immune and hyperimmune serum on the dynamics of phagocytosis of *Plasmodium berghei*-infected erythrocytes. *Rev Inst Med Trop*, 24, 140-147; 1982.

Tosta, C. E. Imunodeficiência associada à malária. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1-5; 1987.

Tosta, C.E.; Muniz-Junqueira, M.I. Malária. In: Brasileiro-Filho G (editor). *Bogliolo Patologia*. Ed Guanab K Ltda, 1441-1455; 2011.

Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Scien*, 193(4254), 673-675; 1976.

Treutiger, C.J.; Heddini, A.; Fernandez, V.; Muller, W.A.; Wahlgren, M. PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Nat Med*, 3,1405–8; 1997.

Turrini, F.; Ginsburg, H.; Bussolino, F.; Pescarmona, G. P.; Serra, M. V. ; Arese, I. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by human monocytes-involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. *BI*, 80,801-808; 1992.

Udomsangpetch, R.; Pipitaporn, B.; Krishna, S. e cols. Antimalarial drugs reduce cytoadherence and resetting of *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*, 173, 691-8; 1996.

Valecha, N.; Srivastava, P.; Mohanty, S.S.; Mitra, P.; Sharma, S.K.; Tyagi, P.K. e cols. Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine in uncomplicated falciparum malaria in Índia. *Mal J*, 8, 1-8; 2009.

Vennerstrom, J. L.; Dong, Y.; Andersen, S. L.; Ager, A. L. Jr.; Fu, H.; Miller, R. E.; Wesche, D. L.; Kyle, D. E.; Gerena, L.; Walters, S. M.; Wood, J. K.; Edwards, G.; Holme, A. D.; McLean, W. G.; Milhous, W. K. Synthesis and antimalarial activity of sixteen dispiro-1,2,4, 5-tetraoxanes: alkyl-substituted 7,8,15,16-tetraoxadispiro[5.2.5. 2]hexadecanes. *J Med Chem*, 43, 2753-8; 2000.

Walker, E.; Brodie, C. *Plasmodium falciparum* malaria in Nigerians who live in Britain. *Brit Med J*, 248, 956; 1982.

Walther, M.; Woodruff, J.; Edele, F.; Jeffries, D.; Tongren, J.E.; King, E. Andrews, L.; Bejon, P.; Gilbert, S.C.; De Souza, J.B.; Sinden, R.; Hill, A.V.; Riley, E.M. Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. *J Immunol*, 177, 5736–5745; 2006.

Wan, H.C.; Melo, R.C.; Jin, Z.; Dvorak, A.M.; Weller, P.F. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *Faseb J*, 21,167–78; 2007.

Wang, J. Hou, L.; Yang, Y.; Tang, W.; Li, Y.; Zuo, J. SM905, an artemisinin derivative, inhibited NO and pro-inflammatory cytokine production by suppressing MAPK and NF-κB pathways in RAW 264.7 macrophages. *Acta Pharmacol S*, 30,1428-1435; 2009.

Wenisch, C.; Parschalk, B.; Zedwitz-Liebenstein, K.; Wernsdorfer, W. ; Graninger, W. The effect of artemisinin on granulocyte function assessed by flow cytometry. *J Antimicrob Chem*, 39,99-101; 1997.

World Health Organization. World malaria report 2012.

World Health Organization. World malaria report 2014.

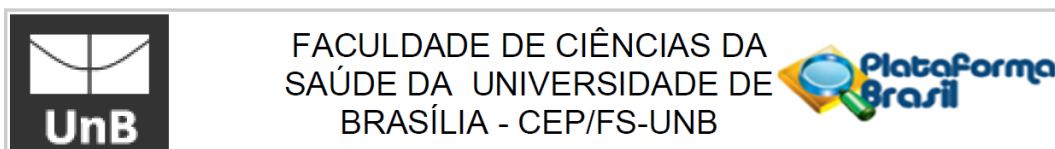
Wykes, M. N.; Liu, X.Q.; Beattie, L.; Stanisic, D. I.; Stacey, KJ, et al. *Plasmodium* Strain Determines Dendritic Cell Function Essential for Survival from Malaria. PLoS Pathog, 3, 96; 2007.

Yu, W.; Bozza, P.T.; Tzizik, D. M. ; Gray, J. P.; Cassara, J.; Dvorak, A. M.; Weller, P. F. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. A J Pathol, 152, 759–769;1998.

.

ANEXOS

Anexo 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência das drogas antiplasmodiais nas funções do sistema imunitário envolvidas na defesa contra as formas eritrocitárias e gametócitos

Pesquisador: OSCAR MARTIN MESONES LAPOUBLE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17190913.2.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 365.997

Data da Relatoria: 31/07/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de mestrado (da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB) intitulado a "Influência das drogas antiplasmodiais nas funções do sistema imunitário envolvidas na defesa contra as formas eritrocitárias e gametócitos intitulado", sob responsabilidade da pesquisadora Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário da pesquisa é avaliar a influência da cloroquina, primaquina, artemeter e lumefantrina, nas funções do sistema imunitário envolvidos na defesa contra as formas eritrocitárias e os gametócitos do plasmódio. E o objetivo secundário é avaliar os determinantes da evolução para gametócitos e a ação gametocitocida das drogas antimaláricas disponíveis, além de avaliar a influência imunomoduladora das drogas antiparasitárias nos mecanismos do sistema imunitário que atuam contra as formas eritrocitárias e gametócitos do plasmódio.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Houve a retificação da avaliação dos riscos, conforme consta no TCLE: " Você poderá sentir algum desconforto na hora da coleta do sangue. Poderá ocorrer uma pequena vermelhidão no local onde for coletado o sangue, e depois ficar roxo no local, como também poderá ter um pouco de

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br



tuntura. Os pesquisadores darão todo o suporte que o senhor necessitar se ocorrer qualquer alteração devida à coleta do sangue." Como benefício, o projeto propõe-se a melhor entender a ação das drogas antimaláricas sobre o sistema imunitários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Anteriormente, foram feitos os seguintes comentários: "[...] fica a dúvida quanto a metodologia se os sujeitos de pesquisa serão pessoas saudáveis ou infectadas, merecendo maiores esclarecimentos quanto a metodologia o presente projeto de pesquisa. Ademais, é importante explicitar quais os fatores de inclusão e de exclusão dos sujeitos de pesquisa (populações vulneráveis, por exemplo), assim como quais serão os benefícios diretos e indiretos para os sujeitos de pesquisa. [...]".

A pesquisadora responsável sanou todas as dúvidas nos seguintes termos: "Serão estudados apenas indivíduos normais, selecionados entre professores, funcionários e alunos que voluntariamente aceitarem participar do presente projeto. O convite será feito pelo pós-graduando OL. Como critério de inclusão: indivíduos saudáveis, entre 18 e 50 anos, que aceitarem voluntariamente participar desta pesquisa. Como critério de exclusão: indivíduos que já tiveram malária, indivíduos que foram em área endêmica para malária nos últimos 6 meses, indivíduos portadores de qualquer doença que possa potencialmente influenciar o sistema imunitário, como doenças infecciosas, neoplásicas, reumáticas, endócrinas, uso de medicamento, fumante, obesidade, ou qualquer outra alteração que os pesquisadores julgarem que possa alterar as funções do sistema imunitário. Os testes serão realizados apenas in vitro utilizando o sangue dos voluntários, e nenhum voluntário normal receberá nenhum tipo de droga, ou terá contato com o parasita. Todos os testes serão realizados exclusivamente in vitro. Os voluntários desta pesquisa não terão benefício direto. O benefício do presente projeto é relacionado apenas ao maior esclarecimento da ação das drogas sobre o sistema imunitário, que poderá propiciar um tratamento mais adequado nas escolhas dos tratamentos para os indivíduos com malária.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatório foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Ratifique-se que a pesquisa possui importância nacional, em especial por se tratar de doença tropical. Sanadas as dúvidas e realizadas as adequações necessárias, opina-se pela aprovação.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 365.997

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BRASILIA, 20 de Agosto de 2013

Assinador por:
Natan Monsores de Sá
(Coordenador)

Anexo 2

Tabela 1. Características antropométricas dos indivíduos cujas amostras sanguíneas foram analisadas para capacidade fagocitária e para os corpúsculos lipídicos

Nº.	Idade (anos)	Sexo	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC
1	45	M	61	1,73	20,3
2	21	M	73	1,80	22,5
3	26	F	76	1,60	29,6
4	23	F	77	1,61	29,7
5	32	M	72	1,70	24,9
6	23	M	64	1,67	22,9
7	32	M	82	1,70	28,3
8	26	M	74	1,66	26,8
9	28	M	79	1,77	25,2
10	45	M	69	1,80	21,2
11	47	M	64	1,66	23,2
12	44	F	65	1,63	24,4
13	30	M	88	1,74	29,0
14	35	M	74	1,75	24,1
15	30	M	82	1,66	29,7
média±DP	32,47± 8,831	M:80% F:20%	73,80± 8,360	1,699 ± 0,064	25,65± 3,29

Anexo 3

Tabela 2. Características antropométricas dos indivíduos cujas amostras sanguíneas foram analisadas para ON e H₂O₂.

Nº.	Idade (anos)	Sexo	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC
1	26	F	66	1,67	23,6
2	45	M	61	1,73	20,3
3	36	M	85	1,72	28,7
4	31	M	76	1,83	22,6
5	38	M	75	1,63	28,2
6	26	F	76	1,60	29,6
7	22	F	46	1,60	17,9
8	33	M	72	1,75	23,5
9	29	M	72	1,76	23,2
10	48	F	68	1,53	29,0
11	32	M	72	1,70	24,9
12	33	F	67	1,60	26,1
13	27	M	75	1,78	23,6
14	30	M	64	1,67	22,9
15	34	M	69	1,65	25,3
16	37	F	61	1,67	21,8
17	21	M	80	1,85	23,3
18	53	M	77	1,65	28,2
19	47	M	70	1,75	22,8
20	30	M	53	1,59	20,9
21	44	F	65	1,63	24,4
22	45	M	78	1,78	24,6
23	30	F	63	1,46	29,5
24	49	M	87	1,74	28,7
25	36	M	89	1,75	29,0
26	36	M	82	1,77	26,1
27	35	M	74	1,75	24,1
28	25	M	70	1,78	22,0
29	21	M	72	1,81	21,9
30	30	M	82	1,66	29,7
31	47	M	60	1,58	24,0
média±DP	34,56 ± 9,139	M:77,3% / F:23,7%	73,88 ± 11,63	1,696 ± 0,084	25,74± 4,08