

HENDA ALINE DA ROSA E VASCONCELOS

**INFLUÊNCIA DA TALIDOMIDA SOBRE A PRODUÇÃO DE
ÓXIDO NÍTRICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NOS
MODELOS CBA E C57BL/6 SUSCEPTÍVEIS E O MODELO
BALB/c NÃO SUSCEPTÍVEL À MALÁRIA CEREBRAL
EXPERIMENTAL MURINA**

Dissertação de Mestrado

**Brasília, DF
2011**

HENDA ALINE DA ROSA E VASCONCELOS

**INFLUÊNCIA DA TALIDOMIDA SOBRE A PRODUÇÃO DE
ÓXIDO NÍTRICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NOS
MODELOS CBA E C57BL/6 SUSCEPTÍVEIS E O MODELO
BALB/c NÃO SUSCEPTÍVEL À MALÁRIA CEREBRAL
EXPERIMENTAL MURINA**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Medicina Tropical da
Faculdade de Medicina da Universidade de
Brasília, como requisito parcial para obtenção
do Título de Mestre**

Orientadora: Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

**Brasília, DF
2011**

*“A medicina existe para o homem, e não o homem para a
medicina.”*

Paul-Eugène Charboneau
(1925-1987)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, filhos e marido, por serem a luz da minha vida, e aos seres inocentes, que com suas vidas permitiram a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, o que é a vida sem luta? Sem persistência e garra? Sem a chance de nos aprofundarmos em algo que realmente nos arrebatava e nos apaixonava? É isso o que eu sinto em relação à oportunidade de poder me aprofundar num tema que tanto assola o meu País. É em função disso que eu agradeço muito a Deus, esta possibilidade de crescer intelectualmente. Aproveito o ensejo para dizer muito obrigado a minha estimada Professora e Orientadora Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, que me facultou a oportunidade de aprender com alguém tão generoso e desprendido dos seus conhecimentos e que teve a paciência e sapiência de transmití-los não somente a mim, mas a todos que a rodeiam.

Não me esqueço da Tatiana Karla Sampaio Borges, que se doou incondicionalmente, para me ensinar os procedimentos laboratoriais, compartilhar as suas experiências, tanto como profissional quanto humanas, entender as minhas dificuldades e escutar os meus anseios, o que nos dias de hoje é um evento tão raro, cabendo aqui uma expressão muito singular para a minha cultura “serei muito grata a você em toda minha vida”.

Outra pessoa que foi enviada por Deus para me auxiliar nessa longa caminhada e que francamente mudou a perspectiva de condução do trabalho pelos seus conhecimentos, persistência, paciência e estímulo e a quem devo expressar um profundo agradecimento e reconhecimento pelos finais de semana e feriados dedicados ao tratamento dos animais e organização da bancada, a Luciana Magalhães Leite, muito obrigada.

Às colegas Marthina Miranda e Érica Alves, pela ajuda incansável e incessante no trabalho de bancada e sempre na perspectiva de grupo e com novas idéias e caminhos para a obtenção dos melhores resultados.

Meu apreço a todos os técnicos do Laboratório de Imunologia, Shirley Couto, Daniela Santana, Simone Gonçalves, Gustavo Barbosa e a futura colega Talyta Cortez Grippe.

Aos professores do Núcleo de Medicina Tropical pelos ensinamentos, pela oportunidade de acrescentar à minha formação, em especial os Professores João Barberino Santos, Cleudson Nery Castro, Pedro Luiz Tauil e as professoras Celeste Aida Nogueira e Luciana Flannery.

Quero agradecer os funcionários do Núcleo de Medicina Tropical, Regina Pacheco e Leandro Mendes Nascimento pela disponibilidade, ajuda e condução sábia na resolução dos problemas burocráticos, ao Nelson Pelet Nascimento, pela preparação dos reagentes.

Meus agradecimentos ao Dr. Rogerio Scapini, Assessor técnico da assessoria de logística de medicamentos e insumos estratégicos em HIV/AIDS, departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais do Programa Nacional de DST e AIDS e Hepatites Virais-SVS/MS e a Assessora Responsável adjunta Tânia Gimenes e ao Hospital Universitário de Brasília pela concessão da droga Talidomida.

Agradeço também ao Biotério do Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz de Salvador-Bahia, ao Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR – FIOCRUZ de Minas Gerais, e ao Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas da Universidade de Brasília por terem gentilmente cedido os animais.

As minhas queridas colegas de turma, Margarita Ochoa Diaz, Helena Bernal, Vanessa Wolff e Ana Isabel de Menezes, naturalmente não poderiam deixar de serem lembradas pelos diversos momentos compartilhados e ao Sr. Luis Bernardo pelo constante auxílio nas ferramentas da computação.

Quero agradecer por último e nem por isso menos importantes, aos meus amados e amigos Pais, meus pilares e porto seguro, que dedicaram as suas vidas tão conturbadas para meu enriquecimento profissional e emocional, nomeadamente, José de Sá e Vasconcelos e Maria Manuela Pereira da Rosa de Sá e Vasconcelos, para dizer que sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus eternos bebês (os meus filhos) Renato, José e Denzel e ao meu amado marido, que é também o meu melhor amigo e o que mais consegue compreender as minhas aspirações e ansiedades.

Finalmente o reconhecimento do apoio, atenção e companheirismo dados pelas minhas irmãs Zaida Loures, Sany Valente e Josy Bartolomeu e os meus queridos sobrinhos Beatriz, Manuela, Jovi e Zeca, que cotidianamente e fisicamente estão longe, mas sempre perto.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XI |
| RESUMO..... | XIV |
| ABSTRACT | XV |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Papel das citocinas inflamatórias | 4 |
| 1.2. Óxido nítrico | 8 |
| 1.3. Peróxido de hidrogênio..... | 12 |
| 1.4. Talidomida..... | 13 |
| 1.5. Modelos experimentais..... | 16 |
| 2 OBJETIVOS | 21 |
| 3 MATÉRIAS E MÉTODOS..... | 22 |
| 3.1. Tipo de estudo..... | 22 |
| 3.2. Animais utilizados na pesquisa | 22 |
| 3.3. Delineamento experimental..... | 23 |
| 3.4. Grupos de estudo..... | 25 |
| 3.5. Inóculo..... | 26 |
| 3.6. Peso | 26 |
| 3.7. Tratamento dos animais com talidomida..... | 27 |
| 3.8. Parasitemia | 27 |
| 3.9. Obtenção dos macrófagos peritoneais | 28 |
| 3.10. Produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais ... | 29 |
| 3.11. Curva padrão para a determinação do peróxido de hidrogênio..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 3.12. Padronização da dose ótima de acetato de forbol miristato (PMA) para determinar a produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais..... | 30 |
| 3.13. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais | 31 |
| 3.14. Curva padrão para determinação da produção de óxido nítrico..... | 32 |
| 3.15. Padronização da dose ótima de lipopolissacarideo (LPS) e interferon- γ (INF) para avaliar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de murinos | 32 |
| 3.16. Análise estatística | 33 |
| 4 RESULTADOS | 34 |
| 4.a. Óxido Nítrico..... | 34 |
| 4.a.1. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos susceptíveis (CBA e C57BL6) ou não (Balb/C) à malária cerebral na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> Anka..... | 34 |
| 4.b. Peróxido de Hidrogênio | 51 |
| 4.b.1. Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis (CBA e C57BL/6) ou não (Balb/C) à malária cerebral na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> Anka..... | 51 |
| 4.c. Parasitemia..... | 70 |
| 4.c.1 Influência da talidomida sobre a evolução da parasitemia em camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção com o <i>Plasmodium berghei</i> Anka..... | 70 |
| 5 DISCUSSÃO | 73 |
| 6 CONCLUSÕES | 87 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 89 |

| | |
|-----------------|-----|
| 8 ANEXOS | 111 |
| 9 TABELAS | 112 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|---|
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| CAMs | Moléculas de adesão |
| CD 36 | Glicoproteína de diferenciação leucocitária, presente também na membrana de plaquetas, monócitos, células endoteliais. É receptor para trombospodina e eritrócitos infectados pelo plasmódio. |
| cGMP | Guanosine 3',5'-cyclicofosfato |
| CSP | Circunsporozoíta |
| DD | Moléculas domínio de morte |
| ERK | Kinase regulada por sinais extracelulares |
| FADD | Proteína dominante de morte associada ao Fas |
| FNT- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| GCs | Guanilato ciclase solúvel |
| GPI | Glicosilfosfatidilinositol |
| ICAM | Molécula superfície de adesão intercelular |
| IKK | Inibidor do NF-KB Kinase |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-13 | Interleucina 13 |
| IL-17 | Interleucina 17 |

| | |
|--------------------------------|---|
| INF-γ | Interferon gama |
| IP | Intraperitoneal |
| JNK | Cinase c-jun N terminal |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| LT α | Linfotoxina alfa |
| MAPK | Proteína cinases ativadas por mitógenos |
| MP | Macrófagos peritoneais |
| NAD | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NF-κB | Fator de transcrição nuclear Kappa B |
| NiK | NF- κ B indução de Kinase |
| NOS | Enzima óxido nítrico sintase |
| NOSI ou nNOS | Enzima óxido nítrico sintase neuronal |
| NOSII ou iNOS | Enzima óxido nítrico sintase induzível |
| NOSIII ou eNOS | Enzima óxido nítrico sintase endotelial |
| PAMPs | Padrões moleculares associados patógenos |
| PARP-1 | Adenosina-ribose polimerase-1 |
| Pb | Infectados com <i>Plasmodium berghei</i> Anka |
| Pb + Tal | Infectados com <i>Plasmodium berghei</i> Anka e tratados com Talidomida |
| PKC | Proteína cinase C |
| PMA | Acetato de forbol miristato |
| rFNT1/p55 | Receptor 1 do Fator de necrose tumoral/p55 |
| rFNT2/p75 | Receptor 1 do Fator de necrose tumoral/p75 |
| Tal | Talidomida |
| TGF-β | Fator de transformação de crescimento beta |

| | |
|--------------------|--|
| Ta1 | Resposta celular tipo 1 |
| Ta2 | Resposta celular tipo 2 |
| TIR domínio | Adaptador citoplasmático Toll/IL-1 receptor |
| rTOLL | Receptor para padrões de reconhecimento TOLL |
| TRAFs 1 | Fatores associados ao receptor do FNT 1 |
| TRAFs 2 | Fatores associados ao receptor do FNT 2 |
| STF | Solução salina tamponada com fosfato |
| VCAM | Molécula de adesão vascular celular |

RESUMO

A malária é uma doença que acomete o homem desde a pré-história, com o quadro clínico extremamente complexo e pleotrófico que varia desde formas assintomáticas até diferentes manifestações clínicas da malária grave, como a anemia e malária cerebral. As formas graves são decorrentes, provavelmente, da hiperativação do sistema imunitário, com liberação aumentada de radicais de oxigênio e nitrogênio. Diferentes aproximações têm sido tentadas para modular a hiperatividade do sistema imunitário, incluindo o uso de drogas com ação sobre o sistema imunitário, como a talidomida. A talidomida é um composto imunomodulador que age diminuindo a produção de fator de necrose tumoral. Tem sido sugerido que a associação da talidomida com drogas antiparasitárias poderia diminuir as altas taxas de mortalidade da malária, pois foi demonstrado que o uso da talidomida em camundongos CBA e BALB/c infectados com o *Plasmodium berghei* Anka apresentaram maior produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio paralelamente ao aumento a sobrevivência. O alvo deste trabalho foi verificar a influência da talidomida sobre a parasitemia e sobre a produção dos radicais livres, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, em modelos animais susceptíveis ou não à malária cerebral. Camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA foram infectados com 10^6 eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA e tratados ou não com talidomida 150mg/Kg/dia, por via oral, a partir do segundo ao oitavo dia de infecção. Outros dois grupos não infectados foram tratados da mesma forma com talidomida e cloreto de sódio 0,9%, respectivamente. No oitavo dia do tratamento foi mensurada a produção do óxido nítrico através da reação de Griess, e a produção do peróxido de hidrogênio pela oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. Houve diferença na resposta de produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio à infecção e ao tratamento com a talidomida nos três modelos experimentais estudados. Houve diferença de resposta também entre as duas linhagens susceptíveis à malária cerebral. Enquanto os camundongos C57BL/6 diminuíram a produção tanto do NO como do H_2O_2 após a infecção e o tratamento, os camundongos CBA apresentaram resposta antagônica, aumentando a produção destes radicais, enquanto que, os camundongos BALB/c tiveram uma produção mais estável de NO e H_2O_2 . Os camundongos C57BL/6 quando infectados pelo *P. berghei* ANKA apresentaram os maiores níveis basais de óxido nítrico, em relação aos outros dois modelos, enquanto a menor produção foi pelos camundongos CBA. Os camundongos BALB/c mostraram uma produção basal de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio intermediária entre os outros dois modelos. Não houve diferença entre os três modelos animais na parasitemia feita no oitavo dia da infecção. Nossos dados sugerem que, independentemente dos camundongos CBA e C57BL/6 produzirem quantidade maior ou menor de radicais de nitrogênio e oxigênio, a resposta desequilibrada de produção destas moléculas, e não necessariamente a quantidade, esteja envolvida na evolução para forma cerebral. Não houve modificação da parasitemia em nenhum dos três modelos animais, sugerindo igualmente que outros fatores são necessários para a defesa antiparasitária, além destes dois mecanismos microbicidas. Os nossos dados contribuem para a melhor compreensão de que ocorrem respostas diferentes, tanto à infecção como ao tratamento com a talidomida, em modelos murinos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, dependentes da base genética do indivíduo.

ABSTRACT

Malaria is a disease that affects human beings since ancient times, it has an extremely complex and pleiotropic clinical picture, ranging from asymptomatic to severe clinical manifestations, such as anemia and cerebral malaria. Severe forms are probably caused by hyperactivation of the immune system with increased releasing of oxygen and nitrogen radicals. Different approaches have been tried to modulate the hyperactivity of the immune system, including the use of drugs that act on the immune system, such as thalidomide. Thalidomide is an immunomodulatory compound that acts by decreasing the production of tumor necrosis factor. It has been suggested that the association of thalidomide with antiparasitic drugs could reduce the high mortality rates of malaria, it was shown that the use of thalidomide in mice CBA and BALB / c infected with *Plasmodium berghei* Anka produced more nitric oxide and hydrogen peroxide to increase survival. The aim of this study was to assess the influence of thalidomide on the parasitemia and the production of free radicals, nitric oxide and hydrogen peroxide in susceptible or non-susceptible murine models to cerebral malaria. BALB/c, C57BL/6 and CBA mice were or were not inoculated with 10^6 *P. berghei* ANKA infected-erythrocytes and treated or not with 150mg/Kg/dia thalidomide, per os, from the second to eighth day of infection. Two other non-infected groups were treated similarly with thalidomide and sodium chloride 0.9%, respectively. On the eighth day of treatment, nitric oxide production was measured by Griess reaction, and hydrogen peroxide production was assessed by the oxidation of phenol red in presence of peroxidase. Different nitric oxide and hydrogen peroxide production to infection and treatment with thalidomide among the three experimental models were observed. NO and H₂O₂ production were also different between the two strains susceptible to cerebral malaria. While C57BL/6 mice decreased the production of NO and H₂O₂ both to infection and treatment, CBA mice increased these value, whereas the BALB/c mice showed more homogeneous production of NO and H₂O₂. The *P. berghei* ANKA infected-C57BL/6 mice showed the highest basal levels production of nitric oxide. While the *P. berghei* ANKA infected-CBA mice had the lowest. The *P. berghei* ANKA infected-BALB/c mice showed an intermediate basal production of nitric oxide and hydrogen peroxide related to the two other murine models. There was no difference in parasitemia on the eighth day of infection among the three animal models. Our data suggest that regardless the level of production of nitric oxide and hydrogen peroxide production, CBA and C57BL/6 mice show cerebral involvement, suggesting that the unbalanced production of these molecules, and not necessarily the amount of it, are involved in the evolution of cerebral disease. There was no change in parasitemia in anyone of the three animal models. These facts also suggest that other factors are required for parasite defense, besides these two microbicidal mechanisms. Our data contribute to a better understanding of that the different responses that occur both to infection and treatment with thalidomide in *Plasmodium berghei* Anka mice infection depends on the background genetic of each individual.

1. INTRODUÇÃO

A malária é considerada ainda como uma das doenças parasitárias mais importantes do mundo. No início do século XX, o número de pessoas expostas ao risco de adquirir a doença compreendia cerca de 80% da população mundial, ocorrendo um declínio até a década de 1970 para 51,9% e em 1994 para 46,05%, chegando ao século XXI com uma tendência a elevação, já que em 2002, 48,3% da população mundial estava exposta ao risco de adquirir malária (HAY, 2004).

Nos últimos dez anos, o número de países com transmissão ativa da doença tem se mostrado estável, com 88 deles em situação de risco, perfazendo uma população exposta de cerca de três bilhões de pessoas (HAY, 2004).

Em 2008, em 109 países a malária era endêmica, sendo 45 localizados na continente africano. Segundo a OMS, estão vivendo no continente africano cerca de 550 milhões de pessoas sob o risco de contrair malária, sendo que 75% da população vivem em áreas de transmissão estável, 17% em zonas de epidemia e apenas 8% em zona de transmissão nula ou baixa.

Estima-se em 247 milhões os casos de malária por ano, causando mais de um milhão de mortes, das quais 91% tiveram lugar na África e 85% delas são crianças menores do que 5 anos de idade (WHO, 2008).

Permanece ainda inaceitavelmente elevada a letalidade das formas graves da doença. Embora apenas 1-2% das pessoas infectadas desenvolvam malária grave, a alta prevalência e incidência da infecção resultam em aproximadamente três milhões de casos graves por ano e quase metade delas

morrerão (GREENWOOD et al., 1991; MISHRA et al., 2007; GREENWOOD & TARGETT, 2009).

São inúmeras as razões para esta alta letalidade, tais como retardo no diagnóstico, com conseqüente atraso no início do tratamento, a falta de suporte clínico adequado e dificuldade de acesso à terapêutica apropriada (MARSH, 1992; MILLER, 2002). Além disso, a emergência generalizada de parasitas resistentes aos medicamentos e alta prevalência de SIDA estão piorando a situação da malária (WHITWORTH & HEWITT, 2005). Embora a letalidade esteja mais associada, mas não necessariamente presente, às altas parasitemias e à falta de tratamento, tem-se verificado que mesmo com todas estas variáveis controladas, pode ainda ocorrer perda de pacientes sugerindo que fatores individuais da resposta do hospedeiro ao parasita tenham também um papel importante na evolução da doença para as formas graves (WHO 2000; WEATHERALL et al., 2002).

A malária é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que infectam e destroem glóbulos vermelhos. Cinco espécies de plasmódios causam a malária em seres humanos, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e o *Plasmodium falciparum*, que é o mais importante, tanto em termos de número de casos clínicos quanto à gravidade da doença (HVIID, 1998; SABBATINI et al., 2010).

O parasita da malária tem dois ciclos bem distintos, o esquizogônico ou assexuado, que ocorre no hospedeiro intermediário vertebrado, e o ciclo esporogônio ou sexuado, que ocorre no hospedeiro invertebrado, no vetor, que são dípteros sugadores de sangue e considerados hospedeiro definitivo (PESSOA & MARTINS, 1974; REY 2001).

As fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*, portadores dos esporozoítas do plasmódio na glândula salivar, ao picarem o homem para sugar sangue, inoculam os esporozoítas do parasita na corrente sanguínea, os quais chegam aos hepatócitos em torno de 30 minutos. As moléculas de adesão da proteína circunsporozoíta (CSP) reconhecem moléculas sulfatadas da membrana dos hepatócitos, as quais aderem, penetram na célula hepática e desenvolvem a primeira esquizogonia, dando origem aos esquizontes tetrininos que evoluem para estágios invasivos, os merozoítas. Esta fase do ciclo é chamada exoeritrocitária, na qual ao final de 8 a 15 dias, na dependência da espécie do plasmódio e do contato prévio do hospedeiro com este parasita, premunição, a célula hepática se rompe liberando milhares de merozoítas que vão invadir as hemácias (PESSOA & MARTINS, 1974, REY, 2001).

Para os *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*, parte dos parasitos permanecem na célula hepática sob a forma de hipnozoítas ou formas latentes, o que determina as recaídas tardias (PESSOA & MARTINS, 1974; REY, 2001).

Os merozoítas, ao penetrarem nas hemácias, desenvolvem a esquizogônia sanguínea, inicialmente como trofozoítas, evoluindo para esquizontes, merozoítas ou rosáceas, que rompem as células sanguíneas liberando merozoítas, que vão invadir novas hemácias (MUTIS et al., 2005). Número substancial de merozoítas expressando componentes como o glicosilfosfatidilinositol (GPI), assim como grandes quantidades de resíduos de produtos do parasita, como hemozoína e fragmentos de membrana do parasita, são eliminados pelo sistema imunitário inato.

O GPI do *Plasmodium falciparum* foi identificado como um importante fator que ativa o sistema imunitário inato do hospedeiro (SCHOFIELD &

HACKETT, 1993). São sintetizados exclusivamente na metade do ciclo de trofozoíto, cujo papel principal é servir de âncora para certas moléculas funcionais da superfície celular (FERGUSON et al., 1999; FRANKLIN et al., 2007). Estes glicolipídeos, também conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), são responsáveis pelas respostas pró-inflamatórias iniciadas no hospedeiro, como parte dos mecanismos de defesa contra o parasita, e também por iniciar a indução da imunidade adaptativa para o controle efetivo da infecção. Os danos destrutivos das respostas inflamatórias induzidas pelos GPIS são devidos à inabilidade do hospedeiro para ajustar e equilibrar as respostas imunitárias inatas (GOWDA, 2007).

1.1. Papel das citocinas inflamatórias

As respostas imunitárias inatas induzidas pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI) são mediadas por uma família de proteínas de transdução de sinal denominadas receptores semelhantes ao Toll (TLRs), que reconhecem especificamente a região conservada, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), presentes na superfície dos microorganismos. Os receptores semelhantes ao Toll (TLRs) humanos compreendem uma família de 13 receptores que também têm sido descritos em camundongos. Os sítios de expressão e as especificidades do ligante foram definidos para nove receptores (MUKHOPADHYAY et al., 2004, AKIRA, 2006).

Assim, os receptores semelhantes ao Toll (TLRs) se ligam a proteínas específicas por meio de seu adaptador citoplasmático Toll/IL-1 receptor (TIR domínio) e ativam várias proteínas como a proteína cinase mitogênica ativada (MAPK) e os precursores de sinalização pela via do NF- κ B. O GPI também

exerce sua bioatividade pela ativação da proteína cinase C (PKC) e juntos ativam a via do NF- κ B, principal fator de transcrição para o início das respostas inflamatórias (TACHADO et al., 1996; 1997). Estes efeitos incluem: (i) produção de fator de necrose tumoral- α (FNT- α) e IL-1, (ii) atividade semelhante à insulina, causando hipoglicemia e lipogênese de triglicérides nos adipócitos; (iii) a expressão de iNOS em macrófagos e células endoteliais, e (iv) regulação da expressão de molécula de superfície de adesão intercelular-1(ICAM), molécula de adesão vascular celular-1(VCAM) e E-selectina nos leucócitos e células endoteliais (SCHOFIELD & HACKETT, 1993; TACHADO et al., 1996).

Com a liberação destas citocinas inflamatórias, o aumento do sequestro de eritrócitos parasitados nos pequenos vasos de grandes órgãos, principalmente cérebro e pulmões, torna-se a característica central da infecção grave pelo *P. falciparum* (MACPHERSON et al., 1985; HO & WHITE, 1999; CHEN et al., 2000).

O sequestro é um fenômeno complexo envolvendo interações moleculares entre os antígenos localizados em protuberâncias (*knobs*) na superfície dos eritrócitos parasitados e receptores do hospedeiro, tais como CD36, trombospondina e ICAM-1, expressos na superfície de células endoteliais (TURNER et al., 1994; RUDIN et al., 1997).

A exacerbação do sequestro é uma conseqüência direta do desequilíbrio de citocinas, principalmente a superprodução do fator de necrose tumoral- α , que provoca aumento da expressão de moléculas de aderência nas paredes do endotélio vascular, que, conseqüentemente, aumentam o processo de sequestro e a gravidade da doença (ÂNGULO & FRESNO, 2002; MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2005; 2007; 2009).

O fator necrose tumoral- α parece ser fundamental, tanto na resposta rápida ao parasita da malária, como na tardia. A excessiva produção de fator de necrose tumoral- α está envolvida no aparecimento de sintomas, como febre e cefaléia, associadas com a doença da malária e têm sido relacionadas à sua gravidade e complicações (CLARK & COWDE, 1987; GRAU, 1989; KWIATKOWSKI, 1990; KWIATKOWSKI & NOWAK, 1991; SHAFFER, 1991).

Amiúde, constatou-se o aumento do fator de necrose tumoral em pessoas com malária grave e esta citocina tem sido também implicada na patogênese da malaria cerebral murina (GRAU et al., 1987; 1989; BROWN et al., 1999). O fator de necrose tumoral é o protótipo de uma superfamília de genes de moléculas ligantes que controlam as defesas do hospedeiro, inflamação, apoptose, autoimunidade e organogênese (KRÖNKE & ADAM-KLAGES, 2002). Frequentemente liga-se a dois tipos de receptores e ambos (rFNT1/p55 e rFNT2/p75) são co-expressos na maioria das células, mas diferem em sua expressão espontânea e induzida. Tem sido demonstrado que o receptor para FNT1 (rFNT1) tem uma função principal na defesa contra infecções por patógenos intracelulares (LUCAS et al., 1997). O fator de necrose tumoral exerce sua função pela interação tanto com o rFNT1, que contém o domínio de morte, como com o receptor para o rFNT2, que não contém o domínio de morte (WAJANT et al., 2003).

Os fenômenos intracelulares que ocorrem após a ligação do fator de necrose tumoral ao seu receptor são complexos e ainda pouco entendidos na malária. Muitas proteínas que são envolvidas nas vias de ativação intracelular após ligação do fator de necrose tumoral ao seu receptor, que interagem direta ou indiretamente com o domínio citoplasmático dos receptores rFNT1 e rFNT2,

mostram que estes receptores estão conectados com a via da apoptose e com a cascata de sinalização que leva à ativação do NF- κ B e JNK (WAJANT et al., 2003).

A sinalização através do receptor para o FNT ocorre por meio de duas classes de proteínas adaptadoras: os fatores associados ao receptor do FNT (TRAFs) e as moléculas domínio de morte (DD). Os TRAF 1 e 2 estão envolvidas na transdução do sinal do FNT, IL-1, IL-17 e de alguns membros dos receptores semelhantes ao TOLL (WAJANT et al., 2003). A proteína adaptadora é selecionada na dependência do receptor possuir o motivo que liga o TRAF ou o motivo que liga o DD (KRÖNKE & ADAM-KLAGES, 2002).

As proteínas adaptadoras TRAF1 e o TRAF2 foram os primeiros fatores associados ao receptor do FNT identificados. O TRAF 2 tem um papel importante em mediar a sinalização estimulada através do rFNT1, ativando a via do NF- κ B e JNK. Além disso, tem sido sugerido que o TRAF2 é um ponto de integração entre os sinais anti e pró-apoptóticos (WAJANT et al., 2003)

A sinalização pelo TRAF1 raramente resulta em apoptose, mas pode estimular muitas vias que levam à ativação celular e diferenciação, mas também a apoptose. A ligação do FNT ao rFNT1 pode sinalizar através de várias moléculas que induzem respostas diferentes: 1) pela via FADD, que induz ativação da via das caspases ; 2) através do MPAK/ERK, que ativa a via do NF- κ B; 3) pela via do NIK/IKK, que também ativa a via do NF- κ B, sendo que os dois últimos estimulam a inflamação, a ativação celular e a produção de citocinas inflamatórias (KRÖNKE & ADAM-KLAGES, 2002).

A produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e as complexas alterações metabólicas concomitantes têm um papel central na imunopatogenia

da malária grave. A adesão de eritrócitos infectados pelo *P. falciparum* nas vênulas pós-capilares de órgãos vitais propicia e agrava os efeitos nocivos das citocinas pró-inflamatórias e nos locais de aderência estes processos são amplificados por um mecanismo de auto-regulação positiva (CLARK & COWDEN, 2003).

A malária cerebral é consequência de uma cascata de eventos envolvendo a produção de toxinas pelo parasita e de citocinas pelo hospedeiro e a amplificação da expressão de receptores para citoaderência nas células do endotélio capilar cerebral. A patogenicidade dos diferentes isolados do parasita, as diferentes bases genéticas do hospedeiro e os diferentes graus de imunidade antimalárica do hospedeiro modulam o determinismo deste fenômeno (CLARK & COWDEN, 2003).

1.2. Óxido nítrico

A participação do óxido nítrico (NO) na patogênese da malária grave também tem sido discutida, embora o seu mecanismo de ação durante a doença ainda seja controverso (CLARK & COWDEN, 2003). Tem sido proposto que o óxido nítrico produzido em excesso durante a infecção malárica mata o parasita *Plasmodium*, por meio de danos oxidativos, mas pode também provocar alterações de sinalização no cérebro, ocasionando dano metabólico e o coma (STEVENSON et al., 2004; CLARK et al., 2003; ANSTEY et al., 1999)

O óxido nítrico foi identificado inicialmente como o fator derivado de endotélio que medeia a vasodilatação dependente da guanilato ciclase solúvel (GCs) (IGNARRO et al., 1987). Este se difunde facilmente através das membranas celulares e pode se ligar com alta afinidade em proteínas contendo

heme ou a proteínas nitrosiladas e apresenta efeitos pleotrópicos complexos e são fundamentais para muitos aspectos fisiológicos, como também patológicos (TUTEJA et al., 2004).

É um radical livre que é produzido durante a conversão enzimática da L-arginina para L-citrulina por membros da família óxido nítrico sintase (NOS) (STUEHR, 1999). Três membros desta família foram identificados: NOS endotelial (eNOS ou NOS3), NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e a NOS induzível (iNOS ou NOS2) (STUEHR, 1999). O óxido nítrico derivado da eNOS tem um papel importante na manutenção da homeostase, inibindo a ativação das células endoteliais, modulando a expressão de moléculas de adesão (CAMs) e a função plaquetária. Inibe a adesão, ativação e agregação de plaquetas tanto pela via cGMP dependente quanto pela via cGMP independente (LAROUX et al., 2000; LOSCALZO, 2001).

No sistema imunitário, o óxido nítrico é um componente da resposta imune inata, é derivado do óxido nítrico sintase induzível (iNOS), sendo responsável pela produção de óxido nítrico pelos fagócitos, porque são altamente expressas após ativação (NATHAN, 1992).

Apesar da polêmica inicial sobre as múltiplas funções do iNOS de fagócitos humanos *versus* murinos, tem sido constatado que os genes e regiões promotoras são extremamente semelhantes (CHARTRAIN et al., 1994; MACMICKING et al., 1997). Além de sua função antimicrobiana, o óxido nítrico pode regular funções do sistema imunitário, incluindo a inibição da proliferação celular de células T e B e a adesão e rolamento de leucócitos no endotélio microvascular (BOGDAN, 2001; VEEN, 2001). Modula também a produção de citocinas, tanto em relação à diminuição da quantidade das citocinas pró-

inflamatórias, interleucina 1 (IL- 1), IL-2, fator de necrose tumoral e o interferon- γ , bem como o aumento da quantidade de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-13 e TGF- β) (BOGDAN, 2001).

Várias hipóteses têm sido propostas em relação ao papel do NO na patogênese da malária. A superprodução de óxido nítrico no cérebro pode afetar o seu papel regulador no sistema nervoso central, atrapalhando a sinalização neuronal, causando danos oxidativos no endotélio, com comprometimento da consciência devido à ação moduladora na transmissão sináptica na malária cerebral (CLARK et al., 2003).

Tem sido relacionado à fisiopatologia da malária cerebral o aumento dos níveis de óxido nítrico, que foram observados no líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças que morreram de malária (WEISS et al.,1998). Além disso, o aumento da expressão do óxido nítrico sintase induzível foi mostrado no cérebro de pacientes com malária cerebral fatal (MANEERAT et al., 2000).

O achado de uma correlação entre níveis plasmáticos elevados de óxido nítrico e uma rápida cura parasitológica e clínica da infecção pelo *Plasmodium falciparum* sugere um papel importante deste radical na defesa contra o parasita, e paralelamente os mesmos níveis aumentados do óxido nítrico também estão associados com doença grave o que pode indicar a participação deste produto na patogênese da malária grave (KREMSNER et al., 1995;1996; WEISS et al., 1998).

Entretanto, a hipoargininemia e a presença dos produtos de degradação do óxido nítrico em pacientes com malária sugerem que a produção do óxido nítrico pode ser limitada na malária (LOPANSRI et al., 2003). E segundo ROTHER et al (2005), os eritrócitos humanos contem arginase I e,

conseqüentemente, com a ruptura das hemácias parasitadas provocam aumento dos níveis de arginase no plasma, sendo um dos mecanismos da hipoargininemia em alguns pacientes, principalmente aqueles com anemia falciforme.

Todavia, em estudos populacionais em áreas endêmicas, foi observado que baixos níveis de óxido nítrico e os seus metabolitos (nitrito urinário e plasmático) e a menor expressão de NOS2 estão associados ao pior prognóstico da doença. Além disso, durante a malária ocorreu aumento da produção de citocinas, tanto as pró-inflamatórias Ta1, o FNT, como anti-inflamatórias Ta2, a interleucina 10 e a maior severidade da doença estava associada à presença destas citocinas. Ademais, a diminuição da expressão de NOS2 e a menor produção de óxido nítrico foram relacionadas com a presença de interleucina 10 e de outras citocinas anti-inflamatórias (ANSTEY et al., 1996).

Citocinas como o FNT e a IL-1 aumentam a expressão das moléculas endoteliais envolvidas na citoaderência na malária grave, como o ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, que por sua vez têm a sua expressão diminuída com aumento dos níveis do óxido nítrico endógeno e exógeno, pela via do NF- κ B. A menor inibição da via de sinalização do NF- κ B pode ser causada por menores valores plasmáticos do óxido nítrico, propiciando maior expressão das moléculas de adesão, do sequestro e conseqüentemente o desenvolvimento da forma grave da malária (ANSTEY et al., 1996).

Esta diminuição na produção do NO, tanto na doença não complicada como na malária grave, pode comprometer e dificultar a capacidade do organismo combater o crescimento do parasita (ANSTEY et al., 1996; KUN, 2003; LOPANSRI, et al., 2003).

A produção aumentada de óxido nítrico influencia também a patogênese da anemia grave (CLARK et al., 1991). Isto ocorre porque o óxido nítrico pode produzir deformidade nas hemácias por inibição do sistema Na^+/K^+ ATPase na membrana dos glóbulos vermelhos e oxidação dos lipídios da membrana através da geração de peroxinitrito.

Associado às citocinas pró-inflamatórias, o óxido nítrico causa uma ampla ativação de poli ADP-ribose polimerase-1 (PARP-1) com rápido esgotamento de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e trifosfato de adenosina (ATP) dos glóbulos vermelhos (CLARK & COWDEN, 2003). Assim, ao inibir a glicólise celular, o óxido nítrico origina danos à membrana dos eritrócitos, aumenta a sua destruição no baço, e associada à hipóxia citopática causada pelos níveis elevados de óxido nítrico suprime a eritropoiese por dano mitocondrial de células progenitoras dos eritrócitos (XIE & WOLIN, 1996; FINK, 2001).

1.3. Peróxido de hidrogênio

Apesar de participarem na imunopatogênese da malária, as espécies reativas de oxigênio estão entre os principais mecanismos parasiticidas e inúmeras observações apontam para o importante papel dos radicais de oxigênio contra os parasitas da malária.

Vários plasmódios, como o *Plasmodium berghei* e o *Plasmodium yoelli* letais e não-letais foram mortos *in vitro* pelo peróxido de hidrogênio (DOCKRELL et al., 1983), o que não ocorreu quando foi adicionado a catalase, sugerindo a eficácia do sistema parasiticida e microbicida dos fagócitos dependente deste radical de oxigênio (OCKENHOUSE, 1984). Foi também

demonstrada à ação letal do peróxido de hidrogênio sobre o *Plasmodium falciparum*. Estudos *in vitro* mostraram o aparecimento de formas em crise dentro hemácias quando incubadas com este reativo de oxigênio (MALBOTRA et al., 1988).

Deste modo, a atuação letal do peróxido de hidrogênio tem sido demonstrada contra o parasita durante a depuração do ciclo eritrocítico, que normalmente ocorre no baço. Assim, STENVENSON et al. (1992), propõem que algumas linhagens de camundongos A/J quando infectados com *Plasmodium chabaudi* AS são susceptíveis ao parasita por não produzirem adequadamente o peróxido de hidrogênio pelos macrófagos esplênicos, ao contrário de outras linhagens que não apresentam defeitos na produção deste metabólito. É possível que outras moléculas microbidas e parasitocidas, como os reativos de nitrogênio, possam intermediar e auxiliar na morte do parasita *in vivo*.

1.4. Talidomida

Devido a toda esta ação intrigante e complexa provocada por citocinas pró-inflamatórias, muito interesse tem sido despertado para entender a ação de agentes que modifiquem favoravelmente a produção das mesmas e que poderiam ser úteis na obtenção das terapias farmacológicas complementares na malária, para diminuição da morbidade, mortalidade e sequelas das formas graves da doença. A talidomida é uma droga que tem sido investigada como coadjuvante ao tratamento da malária grave.

A talidomida é uma droga imunomoduladora, tendo diferentes ações no sistema imunitário. Foi liberada pela FDA (USA) em julho de 1998 para

utilização no tratamento do eritema nodoso da hanseníase (CALABRESE & FLEISCHER, 2000), mas, foi até agora insuficientemente avaliada na malária.

A talidomida inibe a produção de fator de necrose tumoral- α por monócitos humanos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), tanto *in vitro* como *in vivo* (SAMPAIO et al., 1991,1993), e este efeito é provavelmente devido ao aumento na taxa de degradação do ARN mensageiro do FNT (MOREIRA et al., 1993).

A talidomida provocou efeitos antagônicos sobre a produção da interleucina 12 (IL-12), inibindo a produção desta citocina pelas células mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS ou aumentando a produção da IL-12, atuando como sinal co-estimulatório sobre as células T (MOLLER et al., 1997; CORRAL & KAPLAN, 1999), sugerindo que a droga tem um efeito inibitório sobre monócitos, mas exerce uma ação co-estimulatória sobre as células T em atividade, e esta combinação de efeitos pode contribuir para as propriedades imunomoduladoras da droga (CORRAL & KAPLAN, 1999).

Apesar de a talidomida não alterar por si só a expressão da E-selectina, ICAM1 e VCAM, o aumento da expressão dessas moléculas pelo tratamento com LPS ou TNF recombinante foi inibido pela talidomida. Além disso, também foi observada redução do percentual de células endoteliais expressando ICAM-1, após a incubação com FNT e talidomida (ZWINGENBERGER & WNENDT, 1996).

Estas observações evidenciam que a talidomida pode interferir em alguns alvos da imunopatogenia da malária grave e, portanto, esta droga poderia ser útil para evitar a complicações da doença, modulando a

superprodução do FNT e a cascata da resposta inflamatória subsequente, e em particular a produção de radicais de nitrogênio e oxigênio.

A talidomida tem sido avaliada na malária, tendo mostrado ação na hipoglicemia, que foi menos intensa em camundongos infectados com *Plasmodium chabaudi chabaudi* e tratados com talidomida (RAMIREZ-VILLAFUERTE et al., 1998). Estudos em modelo murino susceptível à malária cerebral (CBA) evidenciaram que a talidomida apresenta efeitos benéficos sobre o resultado da infecção, com acréscimo no tempo de sobrevivência e retardando o início das mortes em cerca de dois dias, observou-se ainda aumento significativo na produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico pelos macrófagos dos animais infectados tratados em relação aos animais não tratados, sem, no entanto, alterar a evolução da parasitemia, sugerindo que a talidomida exerce a sua ação como droga imunomoduladora, possivelmente diminuindo a imunopatogenia (MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2005; 2007). (Figura 1).

Devido à possibilidade de utilização da talidomida como droga complementar ao tratamento da malária humana é imperativo entender melhor a influência da droga sobre sistema imunitário nas diversas apresentações clínicas da doença.

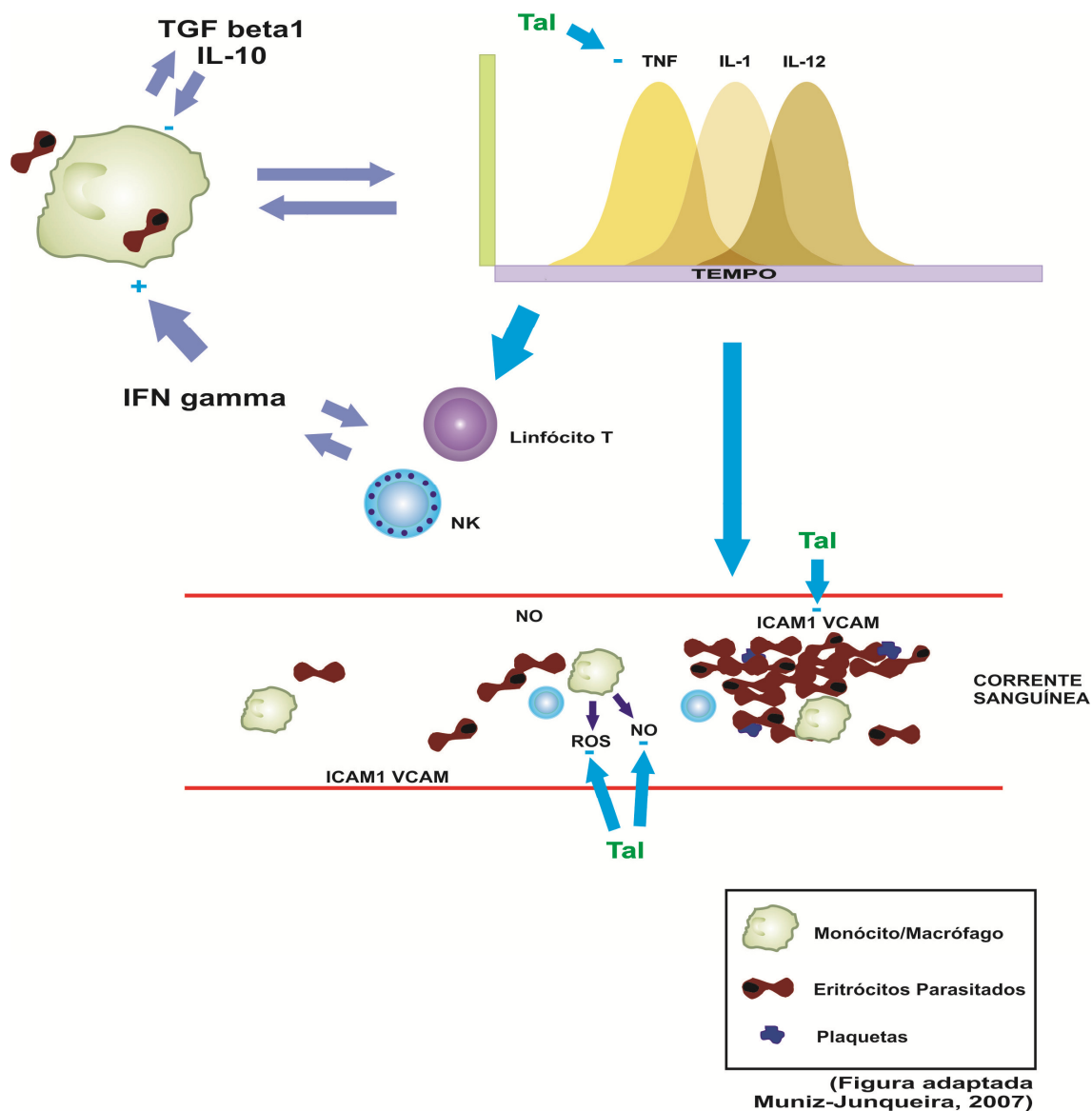


Figura 1. Antígenos de *Plasmodium falciparum* estimulam a produção local de citocinas inflamatórias, principalmente TNF e IL-12, por monócitos /macrófagos, que estimulam a produção de interferon- γ por células NK e linfócitos T. Talidomida (Tal) inibe a produção de TNF e a expressão de moléculas de adesão, modula a produção de radicais livres e melhora a defesa imunológica contra o plasmódio.

1.5. Modelos experimentais

Há algumas características entre as várias formas clínicas da malária que vêm sendo estudadas nos modelos experimentais. Diversas combinações dos parasitas com diferentes modelos experimentais murinos têm sido relatadas na literatura e nos elucidam sobre alguns aspectos da malária.

Vem-se utilizando algumas linhagens de camundongos como modelos experimentais tais como os susceptíveis C57BL/6, CBA ou não susceptíveis à malária cerebral tais como o Balb/C, que quando combinado com a espécie de plasmódio murino *Plasmodium berghei* ANKA, desenvolvem a malária murina e apresentam manifestações clínicas e patológicas semelhantes à malária humana grave provocada pelo *Plasmodium falciparum* (LOU et al., 2001).

Os camundongos C57BL/6 e CBA são susceptíveis à malária cerebral, e quando infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA desenvolvem o quadro clínico expresso por encefalopatia e hepatoesplenomegalia, semelhante à malária complicada em seres humanos, e é fatal para os animais em aproximadamente seis a oito dias, e seu estudo tem contribuído para melhorar a compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos da malária cerebral humana pelo *Plasmodium falciparum*, pois desenvolvem algumas complicações da doença como ataxia, paralisia muscular, convulsões, coma e morte (SMYTH, 1994).

Verifica-se também algumas semelhanças histopatológicas entre a malária cerebral murina e humana, com alterações metabólicas, vasculares, edema cerebral, petéquias, hemorragias focais, quebra na barreira hemato - encefálica e com aumento da pressão intracraniana (PONGPONRATN et al., 2003; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2007).

A malária cerebral murina nos camundongos susceptíveis C57BL/6 e CBA tem sido associada, principalmente, com o sequestro e ativação de leucócitos e plaquetas no tecido cerebral (GRAU et al., 1993), a infiltração perivascular de células mononucleares (HEARN et al., 2000), a alteração da microvasculatura, ativação e redistribuição de células da microglia ativada

(JENNINGS et al., 1997;1998). Algumas alterações estão em contraste com a malária cerebral humana, na qual ocorre envolvimento local irregular dos capilares cerebrais e vênulas, com adesão de hemácias parasitadas pelo *P. falciparum* às células endoteliais, seguido de sequestro, que pode interferir com o fluxo sanguíneo local e, portanto, facilitar o acúmulo de leucócitos, que são ativados por produtos liberados pelo parasita durante a multiplicação local do plasmódio (BATE et al., 1988; LOU et al., 2001; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2007).

Em contraste, os camundongos BALB/c não desenvolvem encefalopatia, nem alterações da vasculatura do tecido cerebral e na quantidade de células, mas sim anemia crônica, que por sua vez é outra manifestação da malária grave no homem, com palidez cutâneo-mucosa, perda de força muscular e hipóxia em aproximadamente três semanas (de KOSSODO et al., 1993).

Diversos fatores estão envolvidos na patogênese da anemia associada à malária, incluindo: destruição de hemácias pelo crescimento do plasmódio intra-eritrocitário (SONI et al., 2005), aumento de peroxidação lipídica (DAS et al.,1999) que podem afetar a membrana de eritrócitos infectados e não infectados (OMEDEO et al., 2003), fagocitose (WICKRAMASINGHE et al., 2000), alteração da eritropoiese (EKVALL, 2003), sequestro de eritrócitos (DONDORF et al., 2004), atraso na resposta da medula óssea, ou uma eritropoiese insuficiente incapaz de compensar as hemácias perdidas, alterações da função esplênica com intensa estimulação de monócitos levando ao aumento da depuração das hemácias. Este processo persiste por aproximadamente 4-6 semanas depois dos parasitas iniciarem o ciclo eritrocitário (LOOAREESUWAN et al., 1987; ENGWERDA, et al., 2005), e isto

ocorre porque mesmo não infectados, os glóbulos vermelhos contêm alterações na membrana, tornando-se rígida e com menor capacidade de deformação, o que os torna vulneráveis à remoção pelo baço. Há também reticulocitopenia, que esta associada ao acréscimo na secreção de eritropoetina, que no caso da malária é devido principalmente a hipóxia celular pela maior destruição dos eritrócitos e aos dos níveis séricos aumentados do FNT- α (SANDAU et al., 2001), que age de igual modo sobre células estromais da medula, estimulando-as a produzirem o fatores de crescimento.

Constatou-se também que tanto nos pacientes infectados com malária ou em animais experimentais infectados ocorre inibição na diferenciação das unidades formadoras de blastos-eritróides (BFU-E) e unidades formadoras de colônias eritroblástica (CFU-E) na medula óssea, com diminuição da produção de eritrócitos (ABDALLA et al., 1988; MARTINEY et al., 2000).

Os modelos de camundongos CBA e C57BL/6 susceptíveis à malária cerebral e o modelo BALB/c não susceptível à forma cerebral têm sido largamente utilizado para a compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos nas formas graves da malária (de SOUZA et al., 2010).

Tem sido demonstrado que o tratamento com talidomida dos camundongos CBA infectados com o *Plasmodium berghei* Anka apresentaram maior produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. Este aumento da produção dos radicais de oxigênio e nitrogênio foi paralelo ao aumento a sobrevivida nestes animais tratados com a talidomida, sugerindo que este aumento foi benéfico para evolução da doença (MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2005). Diferentemente, tem sido mostrado que em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* Anka o tratamento com a talidomida não influenciou

a sobrevivência dos animais infectados (GOLENSER et al., 2006), sugerindo que o efeito desta droga pode depender de parâmetros genéticos dos camundongos. Estes dados levantam a necessidade de uma avaliação mais aprofundada dos efeitos da talidomida nestes dois modelos. Tem sido sugerido um papel para a modulação da produção dos radicais de oxigênio e nitrogênio nos mecanismos protetores da talidomida para evolução das formas graves da malária, sendo então necessário o melhor esclarecimento do papel destes radicais livres na infecção malárica em modelos diferentes, como também o efeito da talidomida sobre a produção destes radicais nestes modelos experimentais.

O esclarecimento da influência da infecção malárica sobre a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio nestes dois modelos susceptíveis a forma cerebral da malária, como também nos animais BALB/c, que não fazem a forma cerebral, pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos imunopatogênicos envolvidos na malária cerebral. Como também a melhor compreensão da ação da talidomida nestes modelos experimentais de diferentes bases genéticas poderá contribuir para o esclarecimento da ação desta droga, para sua potencial utilização como imunomoduladora das formas graves da doença.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Comparar o efeito da talidomida sobre a produção de radicais de nitrogênio, de oxigênio e sobre a parasitemia em camundongos BALB/c, resistentes à malária cerebral e em camundongos CBA e C57BL/6, susceptíveis à forma cerebral da doença, infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA.
- 2) Avaliar a influência da infecção malárica sobre a produção de radicais livres em modelos murinos com diferentes bases genéticas, os camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo

O estudo é do tipo experimental, foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular, da área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, utilizando camundongos das espécies CBA e C57BL/6, como modelos experimentais susceptíveis à malária cerebral murina e os camundongos BALB/c, como modelo não susceptível a malária cerebral, infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA.

As normas éticas para a pesquisa científica com animais foram rigorosamente obedecidas, conforme os princípios éticos para experimentação com animais de laboratório, definidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Brasília (ANEXO 1).

3.2. Animais utilizados na pesquisa

Os animais das linhagens estudadas neste trabalho, eram machos, isogênicos, com idades compreendidas entre 2 a 6 meses, tendo sido uma parte (80) adquirida do Biotério do Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz de Salvador-Bahia, outra parte foi gentilmente cedida pelo Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR - FIOCRUZ de Minas Gerais, e do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas da Universidade de Brasília.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas contendo no máximo dez animais nas gaiolas grandes, com água e ração “*ad libitum*”, sob condições de luz / escuro em ciclo de 12 horas e temperatura de 23-25° c. Os animais

permaneceram em adaptação antes da realização dos experimentos por 21 dias, no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

3.3. Delineamento experimental

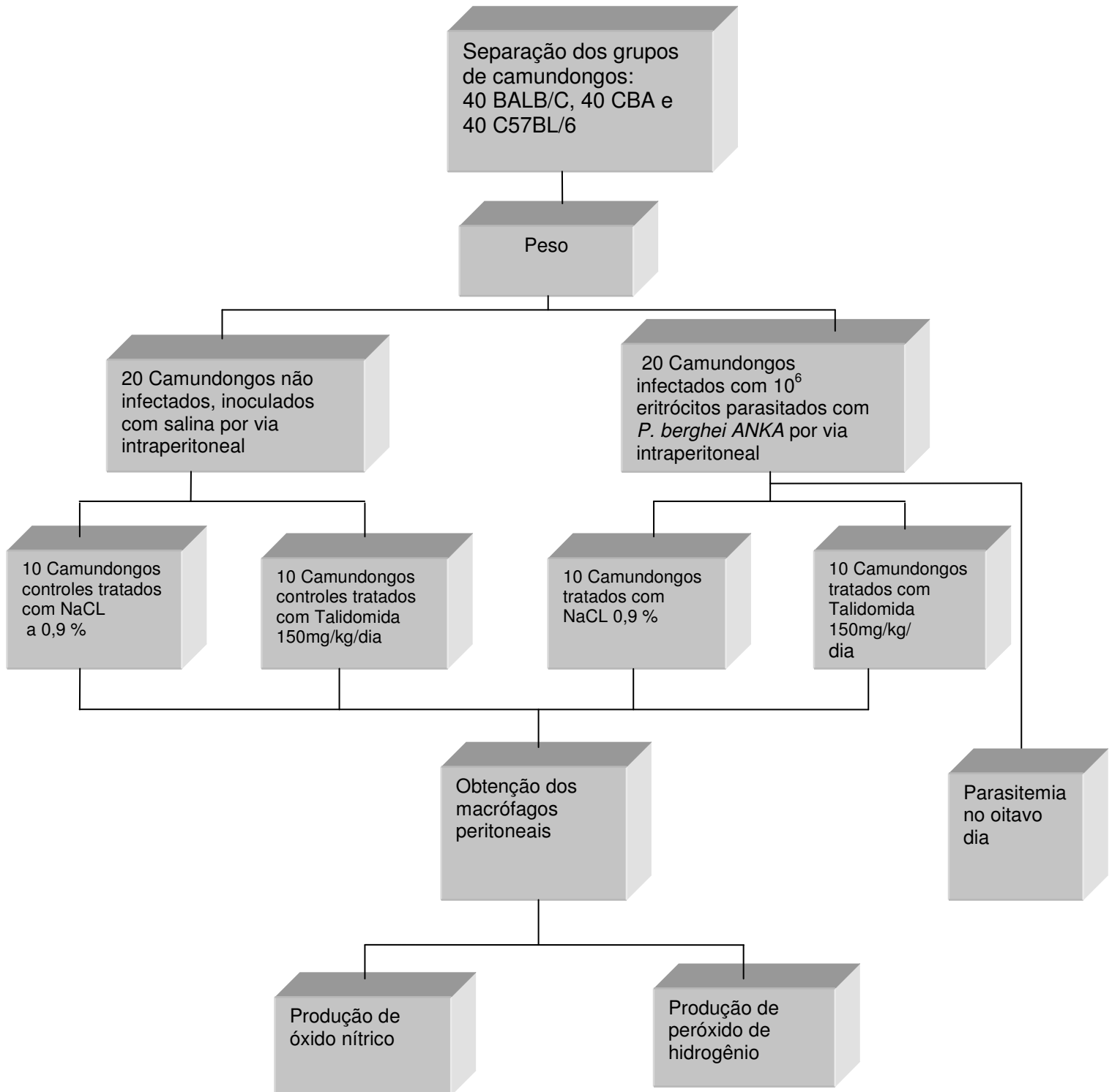
Foram constituídos três grupos de estudos, sendo que dois grupos eram constituídos por camundongos susceptíveis à malária cerebral pertencentes às linhagens CBA e C57BL/6 e o outro grupo foi formado por camundongos não susceptíveis à malária cerebral da linhagem BALB/c.

Todos os grupos foram subdivididos em quatro subgrupos, onde dois subgrupos continham animais não infectados e os outros dois subgrupos foram constituídos por animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Um subgrupo de animais infectados e outro subgrupo de animais não infectados de cada linhagem foram tratados com talidomida 150 mg/kg/dia via oral. E os outros dois subgrupos foram tratados com soro fisiológico a 0,9%.

De todos os animais, os macrófagos peritoneais foram coletados para a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no oitavo dia da infecção.

O sangue da ponta da cauda de cada animal foi obtido no oitavo dia da infecção e a parasitemia foi avaliada do distendido pela determinação da porcentagem de hemácias parasitadas em 500 hemácias, ao microscópio óptico.

Delineamento experimental



3.4. Grupos de estudos:

Para avaliar a influência da talidomida sobre a capacidade dos macrófagos peritoneais dos camundongos das linhagens BALB/c, CBA e C57BL/6 produzirem óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, os animais foram divididos nos seguintes grupos contendo 10 animais em cada grupo:

Grupo 1 - Controle Normal (Cont): 10 camundongos receberam 100 µL de PBS, pH 7,2, por via intraperitoneal no primeiro dia de acompanhamento e foram tratados por via oral com 120µL de soro fisiológico 0,9% a partir do segundo ao oitavo dia de acompanhamento.

Grupo 2 – Talidomida (Tal): 10 camundongos receberam 100 µL de PBS, pH 7,2, por via intraperitoneal no primeiro dia de acompanhamento e foram tratados por via oral com 150 mg/kg/dia de talidomida em 120µL de soro fisiológico 0,9% a partir do segundo ao oitavo dia de acompanhamento.

Grupo 3 - Infectados com plasmódio (Pb): 10 camundongos foram infectados intraperitoneal com 10^6 de eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA suspensos em 200µL de STF, com pH 7,2 e tratados por via oral com 120µL de soro fisiológico 0,9%, do segundo ao oitavo dia de infecção.

Grupo 4 – Infectados com plasmódio e tratados com talidomida (Pb+Tal): 10 camundongos foram infectados intraperitoneal com 10^6 de eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA suspensos em 200µL de STF,

com pH 7,2 e tratados por via oral com talidomida 150mg/Kg/dia em 120µL de soro fisiológico 0,9% do segundo ao oitavo dia de infecção.

3.5. Inóculo

A cepa *Plasmodium berghei* Anka é mantida com solução preservadora de Alsevier em nitrogênio líquido. Com o objetivo de recuperar a virulência da cepa, foram realizadas no mínimo três passagens *in vivo* em camundongos Swiss, antes da infecção dos animais que constituíam os grupos de estudo. Para certificar a aquisição da virulência da cepa, antes de cada passagem do inóculo para o camundongo seguinte coletava-se o sangue da cauda do animal para a quantificação da parasitemia. Os camundongos de passagem eram inoculados com 10^6 eritrócitos parasitados suspensos em solução salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,6, estéril, por via intraperitoneal (CLARK et al, 1990; KREMSNER et al, 1991; NEIL & HUNT, 1992)

O inóculo utilizado para infecção era obtido por punção cardíaca, quando a parasitemia do camundongo Swiss encontrava-se superior a 10% (em torno do 10º-13º dia). A parasitemia era quantificada em um distendido delgado, fixado com metanol e com coloração panótica, pela contagem de 500 eritrócitos. O número total de eritrócitos na suspensão era determinado em hemocítômetro de Neubauer.

3.6. Peso dos animais

O peso de todos os animais foi aferido no primeiro dia na balança CT 200- S Portable – advanced- Ohaus e expresso em gramas.

A média±DP do peso dos animais BALB/c foi de 28,91 g ±1,6, os animais C57BL/6 tiveram uma média±DP de peso de 31,42 g ± 2,9, enquanto que os animais CBA apresentaram média±DP do peso de 27,79 g ± 2,6.

3.7. Tratamento dos camundongos com talidomida

A talidomida foi utilizada na dose de 150mg/kg/dia. Esta dose foi escolhida por ter sido observado ser efetiva em estudos anteriores (HAUSCHILD et al.,1997; MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2005) (FUMED, lote: 100610315) foi diluída em soro fisiológico 0,9% e administrada por via oral em 120 µl com uma pipeta de volume variável.

3.8. Parasitemia

Para avaliar a influência do tratamento sobre a parasitemia foi coletado sangue da cauda dos animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA em tratamento ou não com a talidomida e feito um distendido delgado no dia do sacrifício dos animais, para realização dos testes imunológicos, que correspondeu ao 6-8 dias da infecção para todas as linhagens estudadas. As lâminas eram então coradas utilizando kit rápido de coloração Panótica (New Prov).

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

3.9. Obtenção dos macrófagos peritoneais

Para obtenção dos macrófagos peritoneais, após a realização da parasitemia, os animais eram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. Logo a seguir prendia-se o animal pelas patas na câmara mortuária em decúbito dorsal, realizava-se a assepsia local da pele do abdômen do animal com algodão embebido em álcool a 70 %. Com pinça hemostática se levantava delicadamente a pele do abdômen e realizava uma pequena incisão na pele e peritônio com uma tesoura delicada de ponta romba, permitindo assim o acesso à cavidade peritoneal. Por esta abertura eram instilados 10 ml de salina tamponada com fosfato (STF) 0,15 M gelada, pH 7.2 a 4°C. Após a obliteração da incisão com uma pinça hemostática realizava-se uma leve massagem no abdome, e posteriormente recuperava-se entre 7-10 ml do líquido instilado, contendo os macrófagos peritoneais, por aspiração com uma pipeta Pasteur de vidro, estéril.

O líquido retirado do lavado peritoneal era centrifugado a 200g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante era desprezado e as células ressuspensas em 2 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, EUA) gelado, pH 7,2, acrescido de 20 nM de HEPES (Sigma, EUA), 26,4 mL/L de NaHCO_3 a 7,5% e 25 mg/L de gentamicina e a solução era homogeneizada delicadamente em vortex (Biomixer QL- 901).

Em seguida, as células eram avaliadas quanto a viabilidade e quantificadas em hemocítmetro de Neubauer utilizando solução de nigrosina 0,05%, e depois as células eram novamente ressuspensas em RPMI 1640, pH 7,2, para serem utilizadas nos vários testes funcionais (MUNIZ-JUNQUEIRA et al, 1992).

3.10. Produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais

A produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) era quantificada no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais retirados dos animais, após uma hora de incubação, pela microtécnica de oxidação do vermelho de fenol na presença da peroxidase (PICK & COLS, 1981). O princípio desta técnica baseia-se na oxidação da fenolsulfoftaleína (vermelho de fenol) pela peroxidase na presença de H_2O_2 , formando um produto cuja absorvância pode ser lida por colorimetria.

Para este procedimento, os macrófagos peritoneais coletados da cavidade peritoneal em STF gelada eram centrifugados a $4^\circ C$ em 200 g, durante 10 minutos, o sobrenadante era desprezado e o volume reconstituído com RPMI 1640 incompleto. Após a remoção do sobrenadante, as células eram quantificadas em hemocítômetro de Neubauer e distribuídas, em triplicata, $1,5 \times 10^5$ células por escavação em 200 μL de RPMI 1640, pH 7,2, a $4^\circ C$, sem soro fetal bovino, em placas de cultura de 96 escavações de fundo chato. As células eram então incubadas por 60 minutos em presença de vermelho de fenol a 1% e peroxidase do tipo II (19U/mL), estimuladas ou não com 20 nM ou 100 nM de acetato forbol miristato (PMA) e 100 ng/ml Interferon- γ , por 60 minutos, em câmara úmida, a $37^\circ C$, em presença de 5% de CO_2 em ar. A reação era interrompida com 10 μL de NaOH 1N e em seguida a leitura era obtida em espectrofotômetro de placa (Spectra Max plus 384 – Molecular Devices) em comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram expressos em $\mu M H_2O_2/1.5 \times 10^5$ macrófagos h^{-1} .

3.11. Curva padrão para a determinação do peróxido de hidrogênio

A curva padrão para a determinação de H₂O₂ foi preparada a partir de uma solução estoque de H₂O₂ (Sigma) na concentração de 10 nM diluída seriadamente nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400 respectivamente, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM, 6,25 μM, 3,12 μM e 1,56 μM de vermelho de fenol acrescido de peroxidase tipo II (19U). O padrão 0 μM foi preparado com vermelho de fenol sem peroxidase. A curva foi distribuída em triplicata na placa de 96 escavações, logo após a última incubação dos macrófagos peritoneais e anteriormente ao acréscimo do hidróxido de sódio 1N.

3.12. Padronização da dose de acetato de forbol miristato (PMA) e de interferon-γ para estimular a produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais murinos

Para determinação da dose de PMA e de INF-γ para a estimulação do peróxido de hidrogênio foram feitas várias curvas de dose resposta em diferentes experimentos, para a qual foram coletados vários *pools* de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

Foram utilizadas as concentrações de 0 nM, 10nM, 20nM e 40nM de PMA e de 20 ng, 40ng e 100 ng de INF-γ por escavação. Observamos para as concentrações de 20 e 100 nM de PMA e 100 ng/ml INF-γ por escavação as melhores estimulações para a produção de peróxido de hidrogênio, e foram estas concentrações utilizadas em todos os experimentos.

3.13. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais

O óxido nítrico é um radical livre inalterado que é produzido durante a conversão enzimática da L-arginina para L-citrulina por membros da família de proteínas NOS, que se decompõem rapidamente em nitrito e nitrato. A produção do óxido nítrico (NO) pelos macrófagos foi avaliada pela quantificação do nitrito no sobrenadante das culturas por meio da reação de Griess (GREEN et al.,1981).

Os macrófagos peritoneais foram coletados da cavidade peritoneal como acima descrito e distribuídos em placas de cultura de 96 escavações de fundo chato, estéreis.

Os macrófagos eram incubados em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, por 2 horas, para permitir a aderência dos macrófagos à lâmina. Após a incubação, as escavações eram lavadas com STF, pH 7,2, a 37°C, e incubadas novamente por 24 horas com ou sem 10 ng/ml de LPS (Sigma, EUA) ou com ou sem 10 ng/mL INF- γ (Sigma, EUA) em triplicata, em um volume final de 200 μ L de RPMI 1640, pH 7,2, a 37°, com soro fetal bovino a 10%. Após 24 horas de incubação, a placa era centrifugada por dez minutos a 200g e 100 μ L do sobrenadante das células eram recuperados e acrescentados 100 μ L do reagente de Griess (1-N naftiletileno diamina dihidroclorido a 0,1 %, sulfanilamida a 1% e H₃PO₄ a 25 %).

A reação era lida em espectrofotômetro de placa (Spectra max plus 384 - Molecular Devices), em 540 nm e os resultados foram expressos em densidade ótica como μ M NO₂⁻.

3.14. Curva padrão para determinação da produção do óxido nítrico

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

3.15. Padronização da dose de lipopolissacarídeo (LPS) e de interferon-γ para determinar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de murinos

Para determinar a concentração ótima do lipopolissacarídeo e de interferon-γ para estimular a produção de óxido nítrico, foi coletado um *pool* de macrófagos peritoneais de três camundongos BALB/c, como acima descrito e 1,5x10⁵ células foram distribuídas por escavações em 200 µL de RPMI 1640 sem soro fetal bovino, pH 7,2, a 4°C, em placas de cultura de 96 escavações estéreis. Os macrófagos foram incubados em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, por 2 horas. Após a incubação, as escavações foram lavadas com STF, pH 7,2, a 37°C e incubadas novamente por 24 horas na ausência ou na presença de LPS, nas concentrações de 0ng, 5ng, 10ng, 20ng, 50ng, 1µg, 10µg, 20µg, 50 µg e de INF-γ nas concentrações de 5ng, 10ng, 20ng, 50ng, 100 ng e 1µg. Como as concentrações de 10 ng de LPS e 10 ng de INF-γ produziram as melhores respostas, foram utilizadas nos experimentos para avaliação do óxido nítrico.

3.16. Análise Estatística

Os dados foram analisados previamente para normalidade da distribuição das amostras. E segundo a normalidade e a variância entre as amostras foram utilizados os testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos indicados segundo o número de grupos. Para dois grupos foram aplicados o teste t para amostras com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para aquelas que não tiverem distribuição normal. Para mais do que 2 grupos foram utilizados os testes de ANOVA seguido pelo teste de Student-Neuman Keuls para os grupos com distribuição normal e o de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para as que não tiverem distribuição normal. As análises e os gráficos foram realizados empregando-se o software Graph Prism 5 for Windows (GraphPad Software - San Diego,USA).

4. RESULTADOS

4.a. ÓXIDO NÍTRICO

4.a.1. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos susceptíveis (CBA e C57BL6) ou não (Balb/C) à malária cerebral na infecção pelo *Plasmodium berghei* Anka

A produção de óxido nítrico foi analisada, *in vitro*, utilizando a técnica de Griess, no oitavo dia da infecção, no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais nos três modelos, sem ou após estímulos com lipopolissacarídeo (LPS) e/ou interferon- γ (INF- γ), sendo a concentração expressa em $\mu\text{M NO}_2$.

A. Comparação entre os grupos de tratamento

Para avaliar a influência da infecção per se e do tratamento com a talidomida sobre a produção do NO em animais infectados pelo *Plasmodium berghei* Anka foram comparadas a capacidade de produzir o NO pelos macrófagos peritoneais dos diferentes grupos: Controle (Con), tratados com talidomida (Tal), Infectados (Pb) e Infectados tratados com talidomida (Pb+Tal) isoladamente para cada modelo animal estudado.

a. Produção de óxido nítrico sem estímulos

No modelo BALB/c não houve modificação da produção basal de óxido nítrico pelos grupos tratados com talidomida, infectados, e após o tratamento dos animais infectados pela talidomida em relação ao grupo controle normal ($p=0,48$, Anova) **Figura 2 A**.

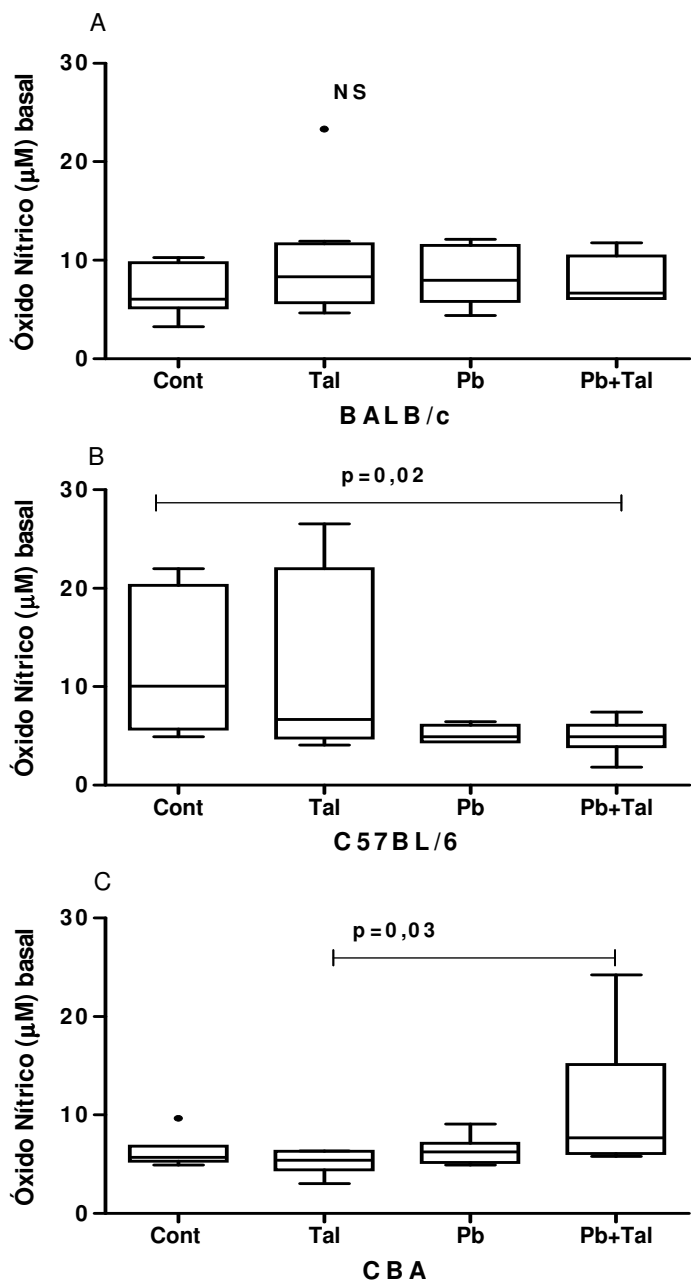


Figura 2. Produção do óxido nítrico basal, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com o *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). Camundongos BALB/c: Não houve diferença estatística na produção de NO entre os grupos ($p > 0,05$). Camundongos C57BL/6: Os animais não infectados produziram mais óxido nítrico do que os animais infectados, $p = 0,02$, teste Kruskal-Wallis, grupo Pb+Tal < Cont pelo método de Dunn). Camundongos CBA: A produção basal de óxido nítrico foi maior pelos animais infectados, $p = 0,03$, teste de Kruskal-Wallis, Pb+Tal > Tal pelo método de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores *outliers* estão mostrados.

Para a linhagem C57BL/6, observou-se uma maior produção basal de óxido nítrico pelos animais do grupo controle, cuja mediana foi de 10,0 $\mu\text{M NO}_2$ e dos animais tratados com a talidomida (6,65 $\mu\text{M NO}_2$) em relação aos animais infectados pelo plasmódio (4,94 $\mu\text{M NO}_2$) e infectados e tratados com a talidomida (4,94 $\mu\text{M NO}_2$), que apresentaram menor produção do NO do que os animais controles ($p=0,02$, teste Kruskal-Wallis, grupo Pb+Tal < Cont pelo método de Dunn para comparação múltipla entre os grupos). **Figura 2 B.**

Resposta oposta foi observada para o grupo de animais CBA em relação aos animais do grupo C57BL/6, sendo que a mediana da produção basal do NO pelos macrófagos peritoneais dos animais infectados e tratados com a talidomida (7,68 $\mu\text{M NO}_2$) foi maior do que a dos macrófagos peritoneais dos camundongos do grupo controle (5,70 $\mu\text{M NO}_2$). Para os animais do grupo infectado que não receberam tratamento com talidomida foi de 6,27 $\mu\text{M NO}_2$ e para os animais do grupo talidomida foi de 5,41 $\mu\text{M NO}_2$, $p=0,03$, teste de Kruskal-Wallis, Pb+Tal>Tal pelo método de Dunn para comparação múltipla entre os grupos. **Figura 2 C.**

b. Produção de óxido nítrico estimulada pelo LPS

Quando as células foram estimuladas com LPS, os camundongos BALB/c dos 3 grupos Tal (12,76 $\mu\text{M NO}_2$), Pb (9,7 $\mu\text{M NO}_2$) e Pb+Tal (19,72 $\mu\text{M NO}_2$) produziram mais NO do que o grupo controle normal (6,65 $\mu\text{M NO}_2$) ($p=0,01$, teste de Kruskal-Wallis, Pb+Tal > Cont pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). **Figura 3 A.**

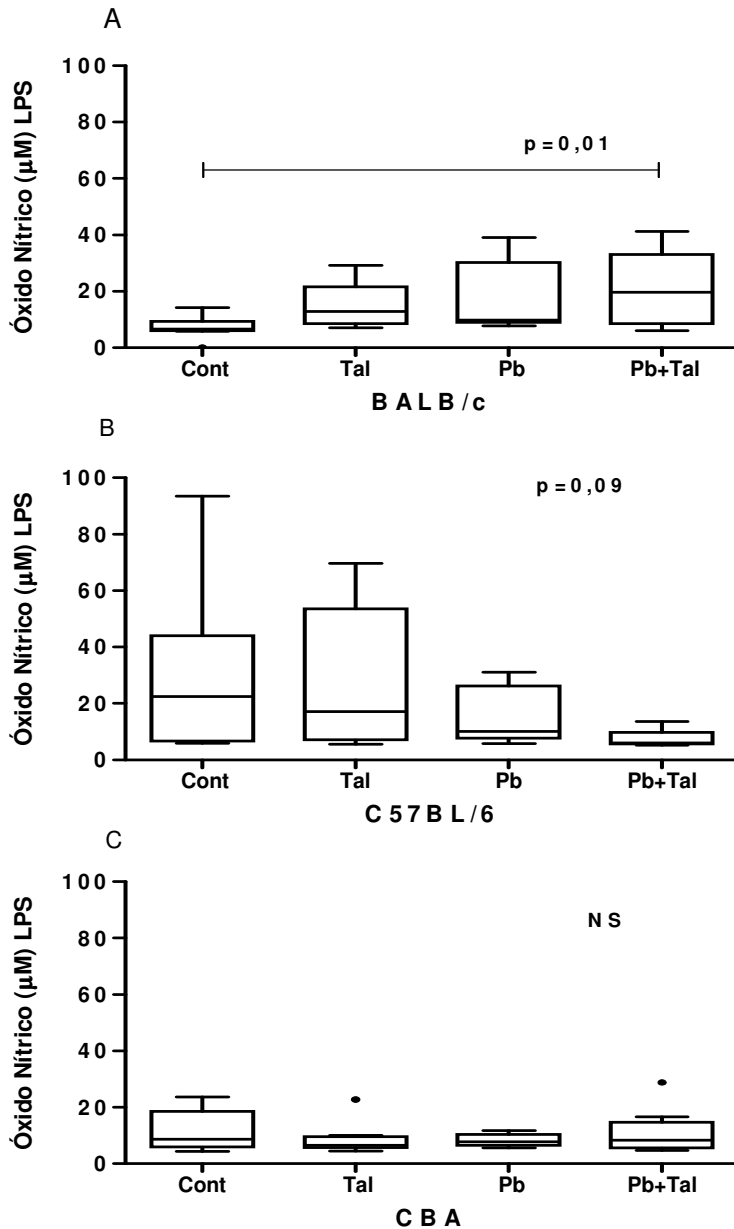


Figura 3. Produção do óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com LPS, obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com o *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). Camundongos BALB/c: Os animais infectados e tratados com talidomida produziram mais óxido nítrico do que os animais não infectados ($p=0,01$, teste de Kruskal-Wallis, $\text{Pb+Tal} > \text{Cont}$ pelo método de Dunn). Camundongos C57BL/6 e CBA: Não houve diferença estatística na produção de NO entre os grupos ($p > 0,05$). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores *outliers* estão mostrados.

Os macrófagos dos camundongos C57BL/6 estimulados com LPS mostraram maior produção de óxido nítrico em relação aos macrófagos peritoneais não estimulados (**Figura 2 B**), entretanto, mantiveram o mesmo padrão da resposta basal destas células, com maior produção de NO pelos grupos não infectados. A mediana da produção do NO pelos macrófagos dos animais não infectados tratados com salina foi de 22,56 $\mu\text{M NO}_2$, para o grupo talidomida foi de 17,16 $\mu\text{M NO}_2$, para o grupo infectado com *Plasmodium berghei Anka* foi de 10,06 $\mu\text{M NO}_2$ e a produção do NO pelos macrófagos dos animais infectados tratados com talidomida foi de 6,08 $\mu\text{M NO}_2$ ($p=0,09$, teste de Kruskal-Wallis). **Figura 3 B**.

Após estímulo com o LPS, não houve diferença estatística na produção de NO entre os grupos quando os macrófagos foram obtidos do modelo CBA ($p=0,78$, teste de Kruskal-Wallis). **Figura 3 C**.

c. Produção de óxido nítrico estimulada pelo IFN- γ

Quando o estímulo utilizado foi o IFN- γ , observamos aumento exacerbado da mediana da produção do NO apenas pelos macrófagos dos camundongos BALB/c do grupo infectado pelo plasmódio (19,20 $\mu\text{M NO}_2$), que foi 2,2 vezes maior que a produção verificada nos animais tratados com talidomida (8,49 $\mu\text{M NO}_2$) e nos animais controles normais (8,54 $\mu\text{M NO}_2$) e 1,7 vezes maior do que nos animais infectados tratados com talidomida (11,05 $\mu\text{M NO}_2$) ($p=0,03$, teste Kruskal-Wallis, com diferença estatística entre os grupos $P_b > T_{al}$ pelo método de Dunn). **Figura 4 A**.

Nos dois modelos susceptíveis à malária cerebral, não houve diferença na produção do óxido nítrico entre os grupos ($p>0,05$). **Figuras 4 B e C**.

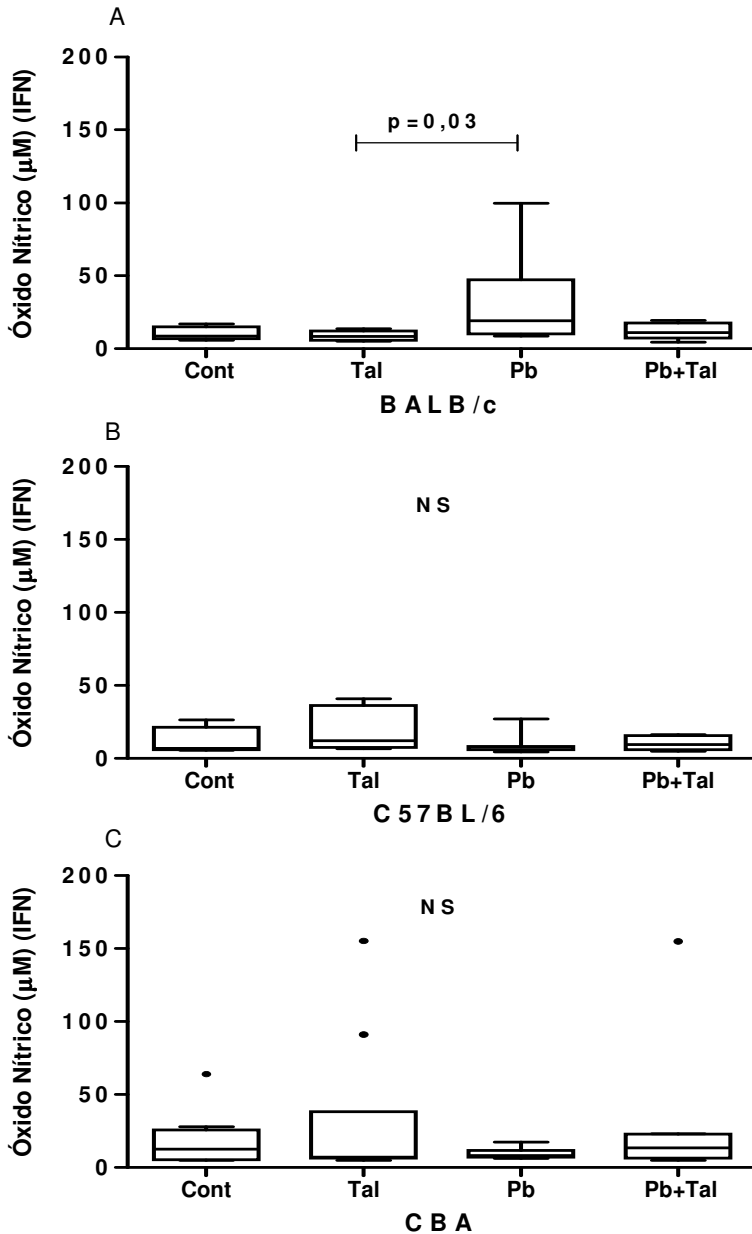


Figura 4. Produção do óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com IFN- γ , obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com o *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). Camundongos BALB/c: Os animais infectados produziram mais óxido nítrico do que os animais não infectados tratados com talidomida, $p=0,03$, teste Kruskal-Wallis, $Pb > Tal$ pelo método de Dunn. Camundongos C57BL/6 e CBA: Não houve diferença estatística na produção de NO entre os grupos ($p > 0,05$). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores *outliers* estão mostrados.

d. Produção de óxido nítrico estimulada pelo LPS mais IFN- γ

Quando foi feito um estímulo mais intenso, pela associação do LPS com o IFN- γ , observamos que apenas os macrófagos peritoneais dos camundongos do grupo controle CBA foram estimulados de forma exacerbada para a produção do NO em relação aos outros grupos estudados. A produção de NO pelo grupo não infectado tratado com salina foi muito maior em relação aos outros grupos (90,74 $\mu\text{M NO}_2$), sendo a mediana do grupo controle normal 12,9 vezes maior do que a do grupo talidomida (7,03 $\mu\text{M NO}_2$) e 12,5 vezes maior que o grupo infectado pelo plasmódio (7,22 $\mu\text{M NO}_2$). Entretanto, o tratamento com talidomida dos animais infectados (14,70 $\mu\text{M NO}_2$) dobrou a produção do NO em relação aos animais infectados e não tratados (7,22 $\mu\text{M NO}_2$) ($p=0,001$, teste Kruskal-Wallis; C >Tal e Pb pelo teste de Dunn). **Figura 5 C.**

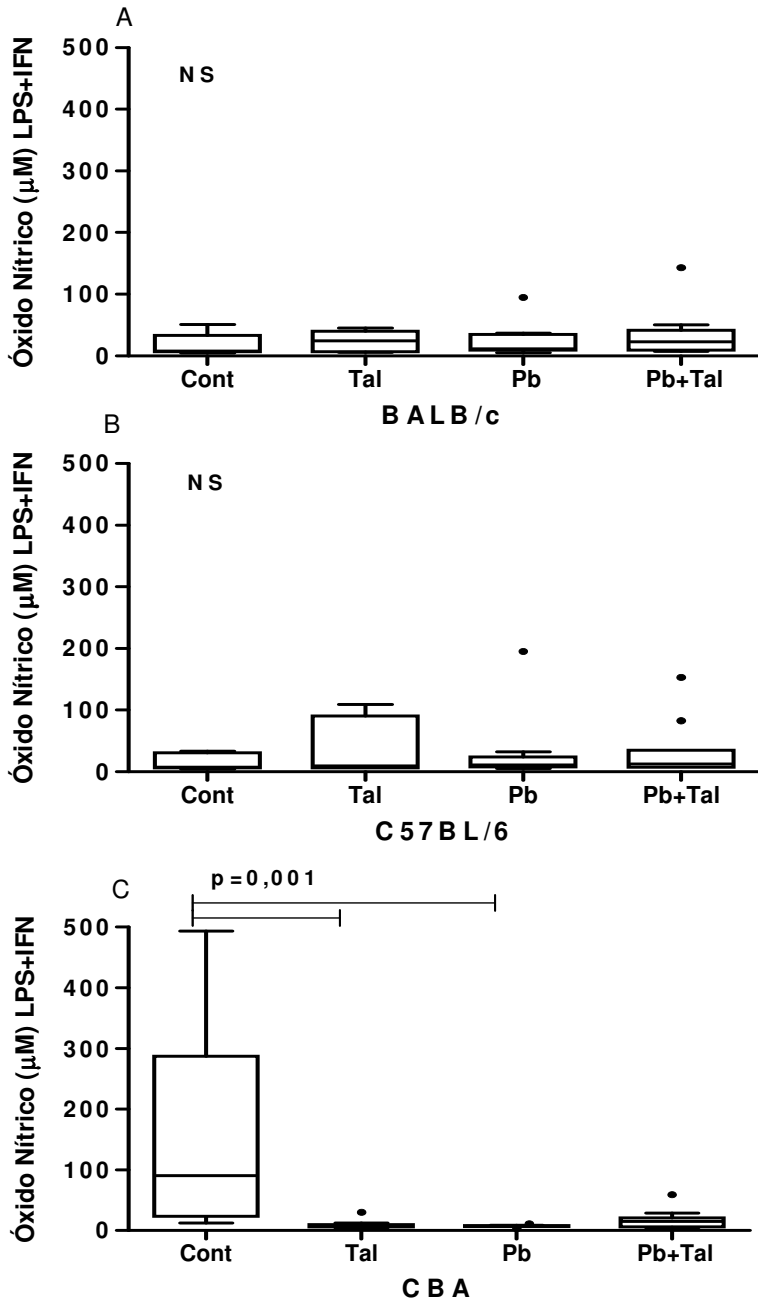


Figura 5. Produção do óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com LPS+IFN- γ , obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com o *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). Camundongos CBA: Os animais controles produziram mais óxido nítrico do que os animais não infectados tratados com talidomida e os infectados, $p=0,001$, teste Kruskal-Wallis; $C > Tal$ e Pb pelo método de Dunn. Camundongos BALB/c e C57BL/6: Não houve diferença estatística na produção de NO entre os grupos ($p>0,05$). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores *outliers* estão mostrados.

Enquanto não houve diferença estatística entre os grupos estudados para os camundongos C57BL/6 e BALB/c ($p > 0,05$). **Figuras 5 A e B.**

B. Comparação entre os modelos animais

Com o objetivo de melhor caracterizar a capacidade basal e estimulada de produzir NO pelos camundongos de diferentes bases genéticas, comparamos a capacidade de produzir o NO entre os animais dos três grupos (BALB/c, C57BL/6 e CBA) submetidos ao mesmo tratamento (controle, talidomida, infecção e animais infectados e tratados com talidomida) e ao mesmo estímulo (basal, LPS, IFN- γ ou LPS+IFN- γ).

Observamos que os macrófagos obtidos de animais geneticamente diferentes respondem aos estímulos diferentemente em relação à produção do NO.

a. Produção de óxido nítrico sem estímulos

Não observamos diferença estatística na capacidade basal de produção de NO pelos macrófagos peritoneais dos animais controles dos três modelos estudados (BALB/c, C57BL/6 e CBA) ($p > 0,17$, teste de Kruskal-Wallis). **Figura 6 C.** Entretanto, as respostas dos três modelos foram diferentes quando os animais foram infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA ou infectados pelo plasmódio e tratados com a talidomida.

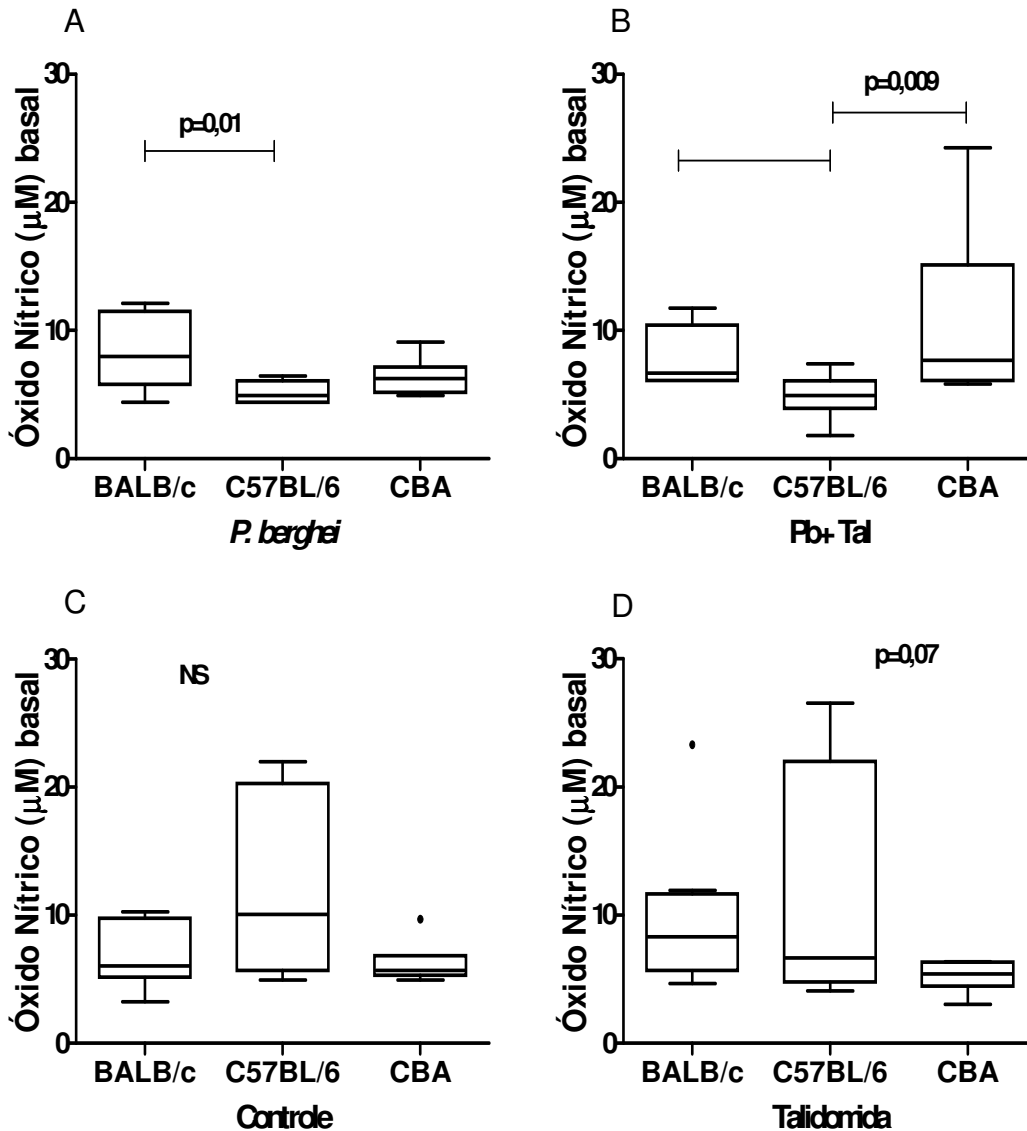


Figura 6. Produção do óxido nítrico basal, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com o *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). Não houve diferença estatística na produção basal de NO entre as linhagens não infectadas ($p > 0,05$). Entre os camundongos infectados pelo plasmódio, os da linhagem CBA produziram mais óxido nítrico do que os camundongos C57BL/6 ($p = 0,01$, teste Kruskal-Wallis, C57BL/6 < BALB/c pelo método de Dunn). A produção basal de óxido nítrico dos animais C57BL/6 infectados e tratados com talidomida foi menor do que os outros dois modelos ($p = 0,009$, teste de Kruskal-Wallis, C57BL/6 < BALB/c e CBA pelo método de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores *outliers* estão mostrados.

Os camundongos BALB/c infectados pelo plasmódio produziram 1,6 vezes mais óxido nítrico ($7,97 \mu\text{M NO}_2$) do que os camundongos C57BL/6 ($4,94 \mu\text{M NO}_2$) ($p=0,01$, teste Kruskal-Wallis, $\text{C57BL/6} < \text{BALB/c}$ pelo método de Dunn). Enquanto a produção do NO pelos macrófagos dos camundongos CBA ficou num nível intermediário entre os outros dois ($6,27 \mu\text{M NO}_2$). **Figura 6 A.**

Estas diferenças foram ainda mais acentuadas para os animais infectados e tratados com a talidomida, sendo a produção do NO pelos camundongos C57BL/6 ($4,94 \mu\text{M NO}_2$) menor do que a dos outros dois modelos, BALB/c ($6,65 \mu\text{M NO}_2$) e CBA ($7,68 \mu\text{M NO}_2$) ($p=0,009$, teste de Kruskal-Wallis, $\text{C57BL/6} < \text{BALB/c}$ e CBA pelo método de Dunn). **Figura 6 B.**

Os animais BALB/c tratados com a talidomida ($8,30 \mu\text{M NO}_2$) apresentaram uma tendência de maior produção do óxido nítrico do que os animais C57BL/6 ($6,65 \mu\text{M NO}_2$) e CBA ($5,41 \mu\text{M NO}_2$), entretanto, a variabilidade de produção do NO foi maior para os animais C57BL/6 do que para os outros modelos ($p=0,07$, teste Kruskal-Wallis). **Figura 6 D.**

b. Produção de óxido nítrico estimulada pelo LPS

Após estímulo com o LPS, os animais dos grupos Tal e Pb+Tal apresentaram respostas diferentes quanto à produção de NO.

Pela comparação entre os animais das 3 linhagens infectados e tratados com talidomida (Pb+Tal) observou-se maior produção do óxido nítrico pelos camundongos do modelo BALB/c, que são resistentes à malária cerebral ($19,72 \mu\text{M NO}_2$) em relação aos dois modelos susceptíveis, sendo essa produção 3,2 maior em relação aos camundongos C57BL/6 ($6,08 \mu\text{M NO}_2$), e

2,3 vezes maior se comparado aos animais CBA ($8,35 \mu\text{M NO}_2$) ($p= 0,01$, teste Kruskal-Wallis). **Figura 7 B.**

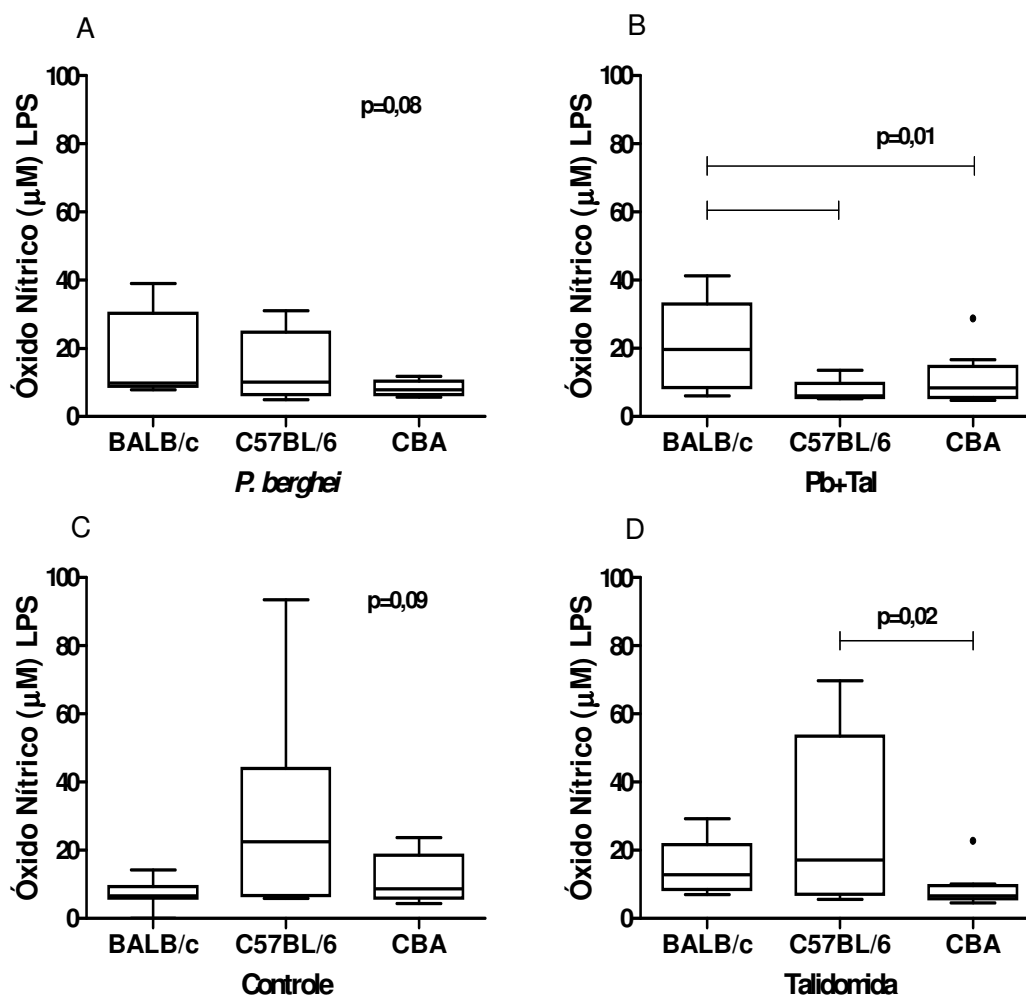


Figura 7. Produção do óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com LPS, obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com o *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). Camundongos BALB/c infectados e tratados com talidomida produziram mais óxido nítrico em relação aos outros dois modelos ($p=0,01$, teste Kruskal-Wallis BALB/c > C57BL/6 e CBA pelo teste de Dunn). A produção de óxido nítrico dos animais C57BL/6 tratados com talidomida foi maior em relação aos animais CBA ($p=0,02$, teste Kruskal-Wallis, C57BL/6 > CBA pelo teste de Dunn). Não houve diferença estatística na produção de NO entre os animais do grupo controle normal e os infectados tratados com salina ($p>0,05$). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores *outliers* estão mostrados.

Quando os animais dos 3 modelos foram tratados com talidomida, ocorreu maior produção do óxido nítrico pelos macrófagos dos animais C57BL/6, sendo 2,5 vezes maior ($17,1 \mu\text{M NO}_2$) do que a da linhagem CBA, ambos susceptíveis à malária cerebral ($6,65 \mu\text{M NO}_2$) ($p=0,02$, teste Kruskal-Wallis). **Figura 7 D.**

As diferenças não foram estatisticamente significantes para os outros grupos. **Figuras 7 A e C.**

c. Produção de óxido nítrico estimulada pelo IFN- γ

Quando o estímulo utilizado foi o IFN- γ , os macrófagos dos animais BALB/c infectados com *Plasmodium berghei* Anka produziram mais NO ($19,20 \mu\text{M NO}_2$) do que os outros modelos, sendo que o C57BL/6 produziu 2,5 vezes menos óxido nítrico ($7,64 \mu\text{M NO}_2$) e os animais CBA produziram 2,3 menos óxido nítrico ($8,06 \mu\text{M NO}_2$) do que os camundongos BALB/c ($p=0,004$, teste Kruskal-Wallis, BALB/c > CBA e C57BL/6 pelo método de Dunn). **Figura 8 A.** Mas quando se compara os outros três tratamentos (Cont, Tal e Pb+tal), não observamos diferença estatística na produção do óxido nítrico entre os diferentes modelos ($p>0,05$). **Figuras 8 B, C e D.**

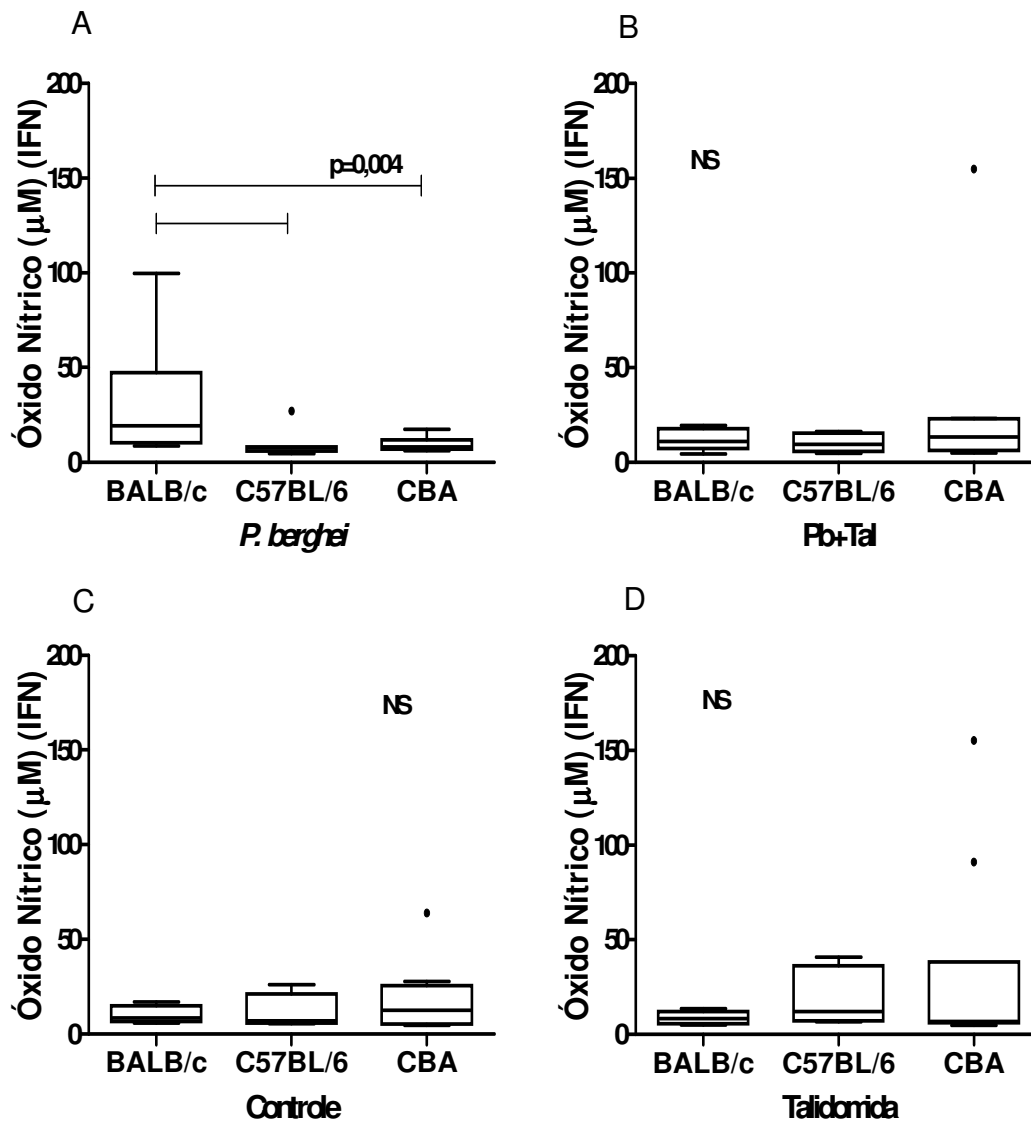


Figura 8. Produção do óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com IFN- γ , obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com o *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). A produção de óxido nítrico pelos camundongos BALB/c infectados pelo plasmódio foi maior que a dos outros camundongos ($p=0,004$, teste Kruskal-Wallis, BALB/c > CBA e C57BL/6 pelo método de Dunn). Não houve diferença estatística na produção de NO entre os modelos com os outros três tratamentos ($p>0,05$). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores *outliers* estão mostrados.

d. Produção de óxido nítrico estimulada pelo LPS+IFN- γ

Quando utilizamos os dois estímulos LPS+INF- γ , apenas os animais controle e os animais infectados pelo plasmódio mostraram diferença entre os 3 modelos. A comparação da produção do NO entre os animais do grupo controle mostrou que os macrófagos peritoneais dos animais CBA produziram muito mais NO (90,74 $\mu\text{M NO}_2$) do que os animais das outras linhagens. Sendo 11,6 vezes maior que a linhagem resistente à malária cerebral BALB/c (7,78 $\mu\text{M NO}_2$), entretanto, também produziram cerca 11,5 vezes mais óxido nítrico que os animais C57BL/6 (7,83 $\mu\text{M NO}_2$), também susceptíveis à malária cerebral ($p=0,01$, teste Kruskal-Wallis, CBA > BALB/c e C57BL6, pelo método de Dunn). **Figura 9 C.**

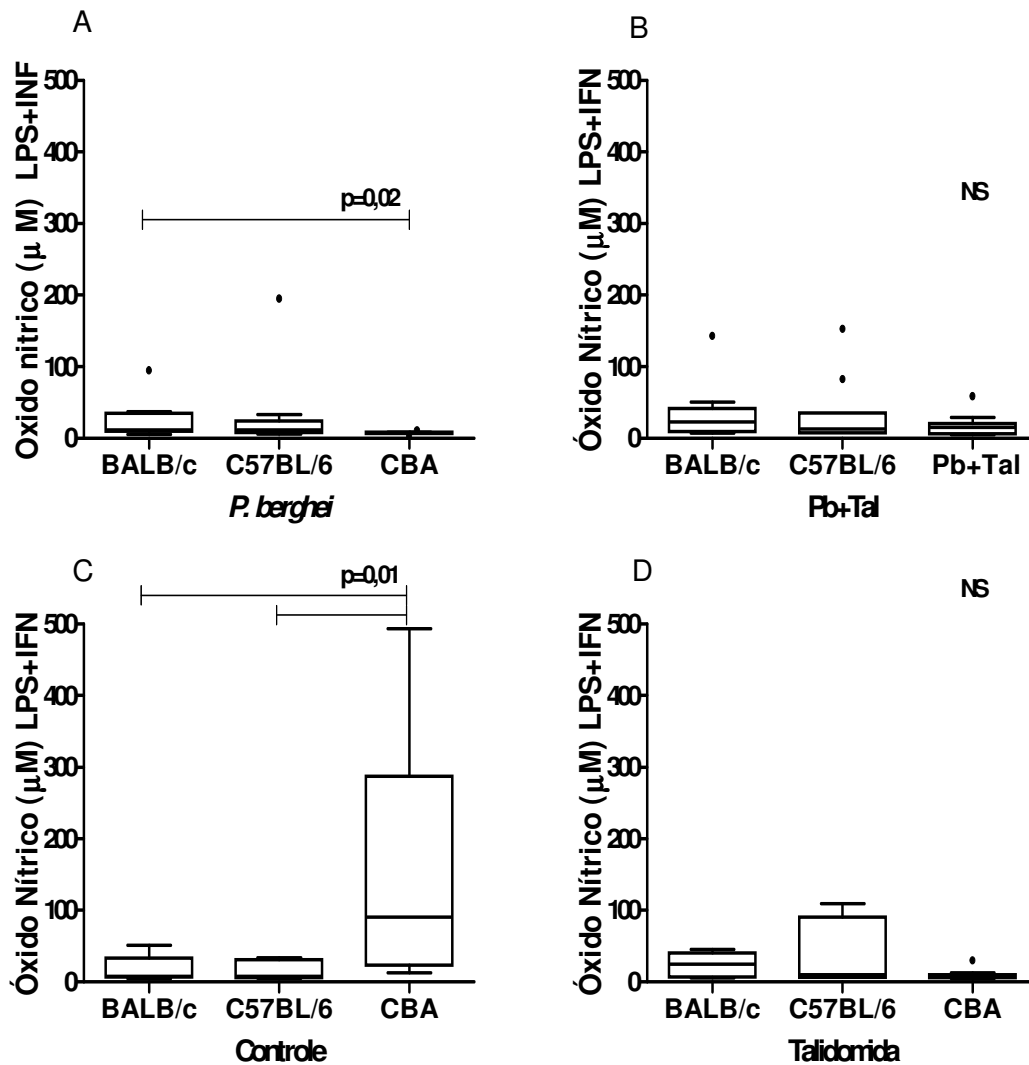


Figura 9. Produção do óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com LPS+IFN- γ , obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com o *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). A produção de óxido nítrico nos camundongos BALB/c infectados pelo plasmódio foi maior em relação à linhagem CBA ($p=0,02$, teste Kruskal-Wallis, BALB/c > CBA pelo método de Dunn). Os camundongos CBA do grupo controle produziram comparativamente mais óxido nítrico do que os camundongos BALB/c e C57BL/6 ($p=0,01$, teste Kruskal-Wallis, CBA > BALB/c e C57BL6, pelo método de Dunn). Não houve diferença estatística na produção de NO entre os modelos para os outros grupos de tratamento ($p>0,05$). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores *outliers* estão mostrados.

O inverso ocorreu na vigência da infecção, os camundongos BALB/c, que não são susceptíveis a forma cerebral, quando infectados pelo plasmódio (11,4 $\mu\text{M NO}_2$) produziram 1,6 vezes mais óxido nítrico que os camundongos CBA (7,22 $\mu\text{M NO}_2$), que são susceptíveis, enquanto a resposta dos camundongos C57BL/6 (11,57 $\mu\text{M NO}_2$) foi semelhante a observada para os camundongos BALB/c $p=0,02$, teste Kruskal-Wallis, BALB/c > CBA pelo método de Dunn). **Figura 9 A.**

As diferenças não foram significantes para os animais tratados apenas com a talidomida e para o grupo infectado e tratado com a talidomida. **Figura 9 B e D.**

4.b. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

4.b.1. Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis (CBA e C57BL/6) ou não (Balb/C) à malária cerebral na infecção pelo *Plasmodium berghei* Anka

A produção de peróxido de hidrogênio basal e após a estimulação com PMA (nas concentrações de 20 e 100 nM) e INF- γ nos três modelos murinos estudados foi analisada nos sobrenadantes das culturas dos macrófagos peritoneais entre 6-8 dias após a infecção malárica. A produção do H₂O₂ foi avaliada, *in vitro*, pelo método de Pick e Keisari (1980) de oxidação de vermelho de fenol na presença de peroxidase, sendo a concentração expressa em $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$.

A. Comparação entre os grupos de tratamento

No intuito de avaliar a influência do tratamento com a talidomida sobre a produção do H₂O₂ em animais infectados pelo *Plasmodium berghei* Anka, nos modelos experimentais estudados, foram comparadas a capacidade de produzir este radical pelos grupos: Controle (Con), tratados com talidomida (Tal), Infectados (Pb) e Infectados tratados com talidomida (Pb+Tal), isoladamente para cada modelo animal estudado.

a. Produção de peróxido de hidrogênio sem estímulos

Não houve diferença estatística na produção basal do peróxido de hidrogênio entre os diferentes grupos dos camundongos BALB/c ($p=0,54$, teste Kruskal-Wallis). **Figura 10 A.**

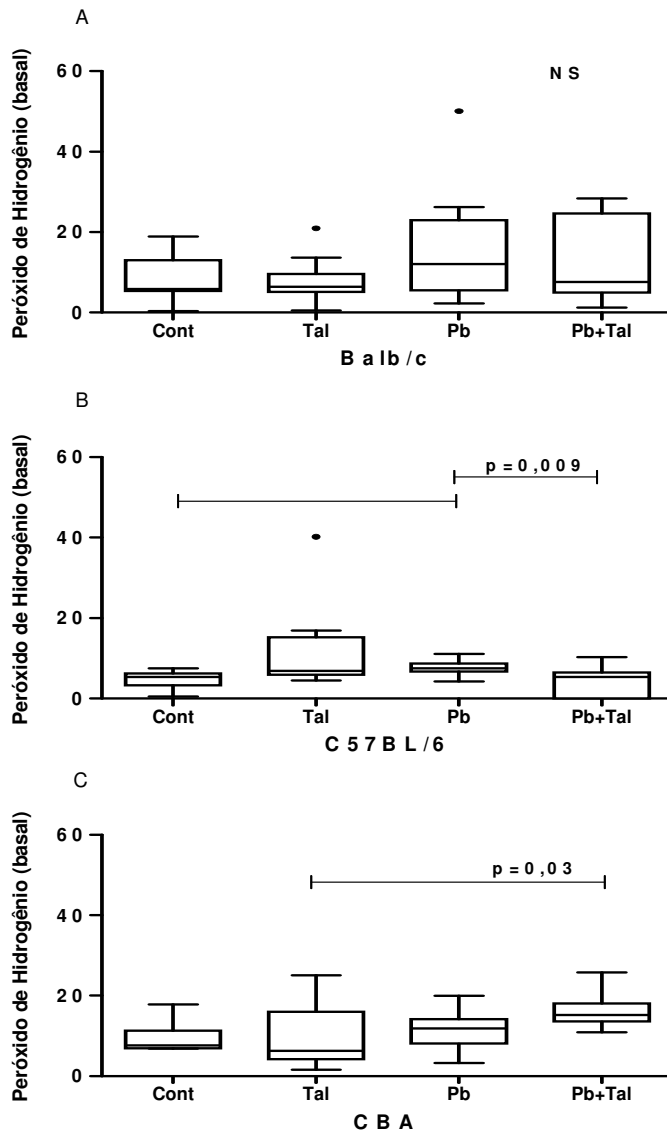


Figura 10. Produção de peróxido de hidrogênio basal, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). 1) Não houve diferença estatística na produção do peróxido de hidrogênio basal entre os diferentes grupos de camundongos BALB/c. 2) Os camundongos C57BL/6 infectados e tratados com a talidomida (Pb+Tal) produziram menor quantidade de peróxido de hidrogênio do que o grupo infectado e o grupo tratado (Tal) ($p = 0,009$, teste Kruskal-Wallis). 3) A produção de peróxido de hidrogênio pelos camundongos CBA foi maior nos animais infectados tratados com a talidomida do que os animais tratado com a talidomida ($p = 0,03$ teste Kruskal-Wallis, $Pb+Tal > Tal$, pelo método de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os pontos *outliers* estão representados.

Para os camundongos C57BL/6, tanto a infecção pelo plasmódio (Pb) como o tratamento dos animais com a talidomida (Tal) aumentou a produção do H_2O_2 . Entretanto, o tratamento dos animais infectados pelo plasmódio com a talidomida (Pb+Tal) produziu um efeito oposto, havendo diminuição da produção deste radical. Os macrófagos peritoneais do grupo infectado pelo *Plasmodium berghei Anka* produziram $7,59 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$ basal, que foi 1,4 vezes maior que o produzido pelos animais do grupo controle ($5,36 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$), enquanto que foi 1,3 vezes maior que o grupo infectado e tratado com a talidomida, que produziu $5,4 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$ ($p=0,009$, teste Kruskal-Wallis). **Figura 10 B.**

A resposta dos camundongos CBA foi oposta à dos animais C57BL/6, a outra linhagem susceptível à malária cerebral. As medianas da produção basal do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos dos camundongos CBA foi o dobro no grupo infectado e tratado com talidomida ($15,2 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$) do que no grupo controle normal ($7,62 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$), foi 1,4 vezes maior do que o grupo infectado (Pb) ($11,89 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$) e foi 2,4 maior que os animais não infectados tratados com talidomida ($6,28 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$) ($p=0,03$, teste Kruskal-Wallis, sendo Pb+Tal > Tal pelo método de Dunn). **Figura 10 C.**

b. Produção de peróxido de hidrogênio estimulada com PMA

Utilizando como estímulo 20 nM de PMA, apenas os camundongos C57BL/6 mostraram resposta estatisticamente diferente entre os grupos, sendo que para os camundongos BALB/c a diferença ficou no limite da significância ($p=0,05$).

A produção do peróxido de hidrogênio no modelo experimental BALB/c submetido ao estímulo com PMA 20 nM foi a seguinte: o grupo controle (Con) apresentou a mediana de $11,06 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$, a mediana do grupo talidomida (Tal) foi $5,64 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$, nos infectados (Pb) foi de $14,7 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$ e nos infectados e tratados com talidomida (Pb+Tal) a mediana foi de $7,31 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$ ($p=0,05$, teste Kruskal-Wallis).

Figura 11 A.

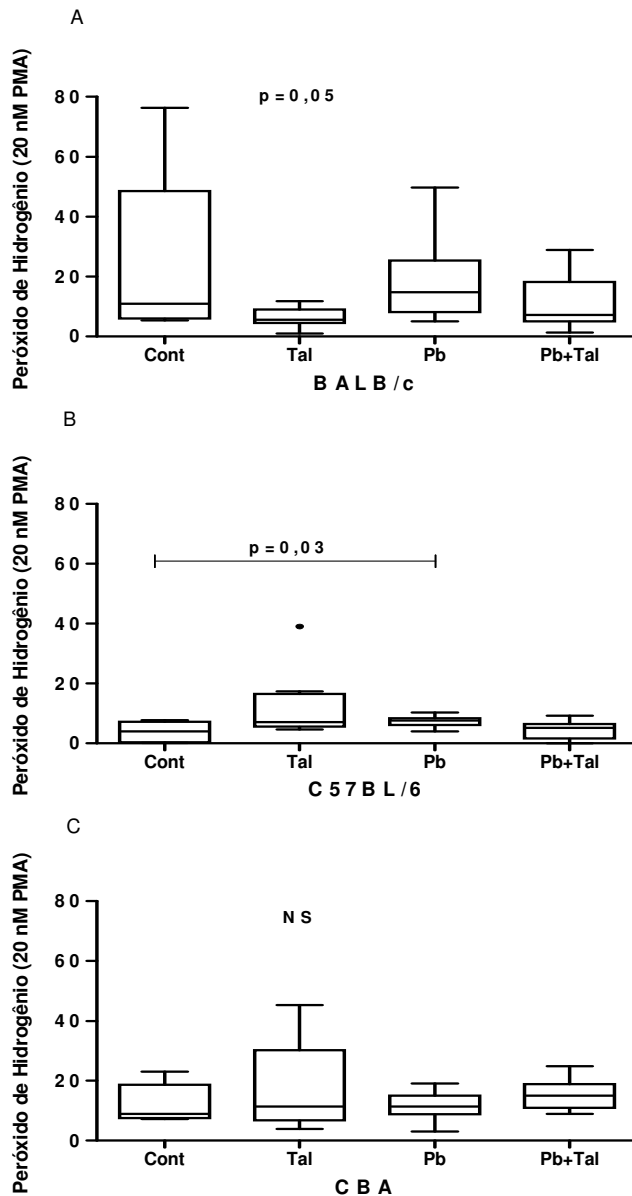


Figura 11. Produção de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com 20 nM PMA, obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). 1) A diferença na produção do peróxido de hidrogênio pelos camundongos BALB/c encontra-se no limite da significância estatística ($p = 0,05$ teste Kruskal-Wallis). 2) A produção de peróxido de hidrogênio pelos camundongos C57BL/6 foi maior nos animais infectados (Pb), do que os animais não infectados tratados com salina ($p = 0,03$ teste Kruskal-Wallis). 3) Não houve diferença estatística na produção do peróxido de hidrogênio basal entre os diferentes grupos de camundongos CBA. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os pontos *outliers* estão representados.

Para o modelo C57BL/6, a infecção (Pb) ($7,71 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$) e o tratamento com a talidomida (Tal) ($7,14 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$) aumentaram a produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais em relação aos grupos controle ($4,04 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$) e o infectado tratado com talidomida ($5,15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$) ($p=0,03$ teste Kruskal-Wallis). **Figura 11 B.**

Não houve diferença estatística na produção de peróxido de hidrogênio entre os diferentes grupos dos camundongos CBA ($p=0,54$, Kruskal-Wallis). **Figura 11 C.**

No entanto, após estímulo com 100 PMA, não se constatou diferença estatística na produção do peróxido de hidrogênio entre os distintos grupos dos animais BALB/c, C57BL/6 e CBA (**Figura 12 A, B, C**).

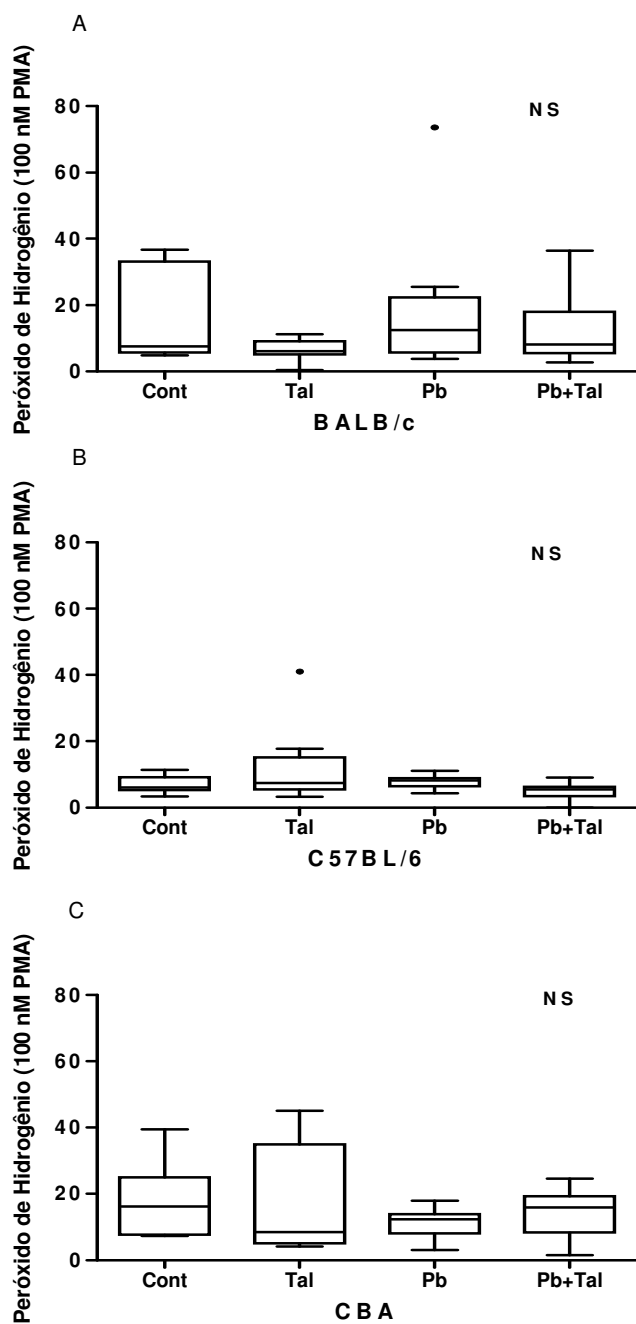


Figura 12. Produção de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com 100 nM PMA, obtidos de camundongos Balb/C, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). Não houve diferença estatística na produção do peróxido de hidrogênio entre os diferentes grupos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os pontos *outliers* estão representados.

b. Produção de peróxido de hidrogênio estimulada com IFN- γ

Quando os macrófagos foram estimulados *in vitro* com o interferon- γ , os fagócitos dos camundongos susceptíveis à malária cerebral dos dois modelos (C57BL/6 e CBA) responderam de formas opostas quando infectados e tratados com a talidomida, enquanto que não houve modificação nas respostas dos camundongos BALB/c resistentes à malária cerebral (**Figura 13 A,B,C**).

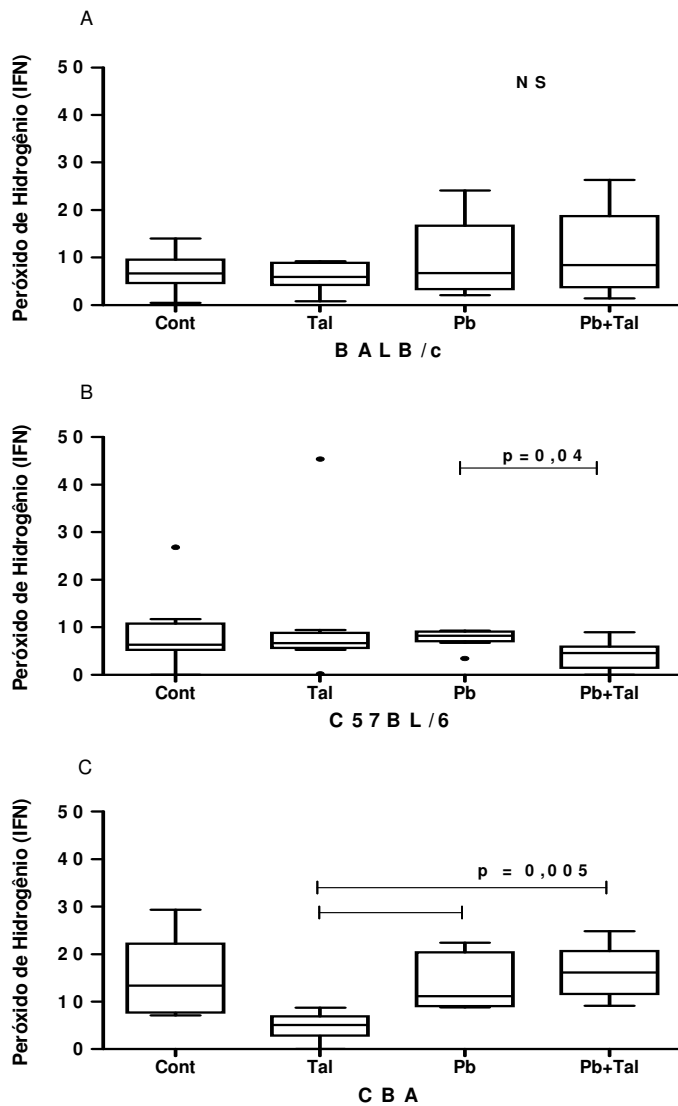


Figura 13. Produção de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com IFN- γ , obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9% (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). 1) Não houve diferença estatística na produção do peróxido de hidrogênio entre os diferentes grupos de camundongos BALB/c. 2) Os camundongos C57BL/6 infectados e tratados com a Tal (Pb+Tal) produziram menor quantidade de peróxido de hidrogênio do que o grupo infectado (Pb) ($p=0,04$ teste Kruskal-Wallis, $PB+Tal < Pb$ pelo método de Dunn). 3) A produção de peróxido de hidrogênio pelos camundongos CBA foi maior nos animais infectados tratados ou não com a talidomida do que os tratados com a droga (Tal) ($p=0,005$ teste Kruskal-Wallis, $Tal < Pb$ e $Pb+Tal$ pelo método de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os pontos *outliers* estão representados.

O tratamento com a talidomida dos animais C57BL/6 infectados pelo plasmódio (Pb+Tal) ($4,52 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$) foi 1,8 vezes menor do que a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos animais do grupo infectado não tratados (Pb) ($8,23 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$) ($p=0,04$, teste Kruskal-Wallis, $\text{Pb+Tal} < \text{Pb}$ pelo método de Dunn). **Figura 13 B.**

Para os camundongos CBA, os dois grupos infectados, tratado ($16,1 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$) ou não com talidomida ($11,1 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$), produziram mais peróxido de hidrogênio que o grupo não infectado tratado com talidomida ($5,11 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$), ($p=0,005$, teste Kruskal-Wallis, $\text{Pb e Pb+Tal} > \text{Tal}$). **Figura 13 C.**

B. Comparação entre os modelos animais

Com o objetivo de melhor caracterizar a capacidade basal e estimulada de produzir peróxido de hidrogênio pelos camundongos de diferentes bases genéticas, comparamos a capacidade de produzir o H_2O_2 entre os animais dos três grupos (BALB/c, C57BL/6 e CBA) submetidos ao mesmo tratamento (controle, talidomida, infecção e animais infectados e tratados com talidomida) e ao mesmo estímulo (basal, LPS, $\text{IFN-}\gamma$ ou $\text{LPS+IFN-}\gamma$).

Como para o óxido nítrico, verificamos que os macrófagos obtidos de animais geneticamente diferentes respondem aos estímulos diferentemente em relação à produção do H_2O_2 .

a. Produção de peróxido de hidrogênio sem estímulos

Embora tanto os camundongos CBA quanto os C57BL/6 sejam susceptíveis à forma cerebral da malária, observamos que os dois modelos mostraram produção basal de peróxido de hidrogênio de formas opostas. Nos animais do grupo controle (Con), a produção de H_2O_2 foi maior pelos macrófagos dos camundongos CBA ($7,62 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$) do que C57BL/6 ($5,36 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$) $p=0,03$, Kruskal-Wallis, CBA>C57BL/6 pelo método de Dunn). **Figura 14 C.** O mesmo ocorreu para os animais infectados e tratados com a talidomida (Pb+Tal), sendo $15,24 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$ para os camundongos CBA e $5,45 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$ para os camundongos C57BL/6 ($p=0,003$, Kruskal-Wallis, CBA>C57BL/6 pelo método de Dunn). **Figura 14 B.** Não houve diferença estatística para os outros grupos. **Figuras 14 A, D.**

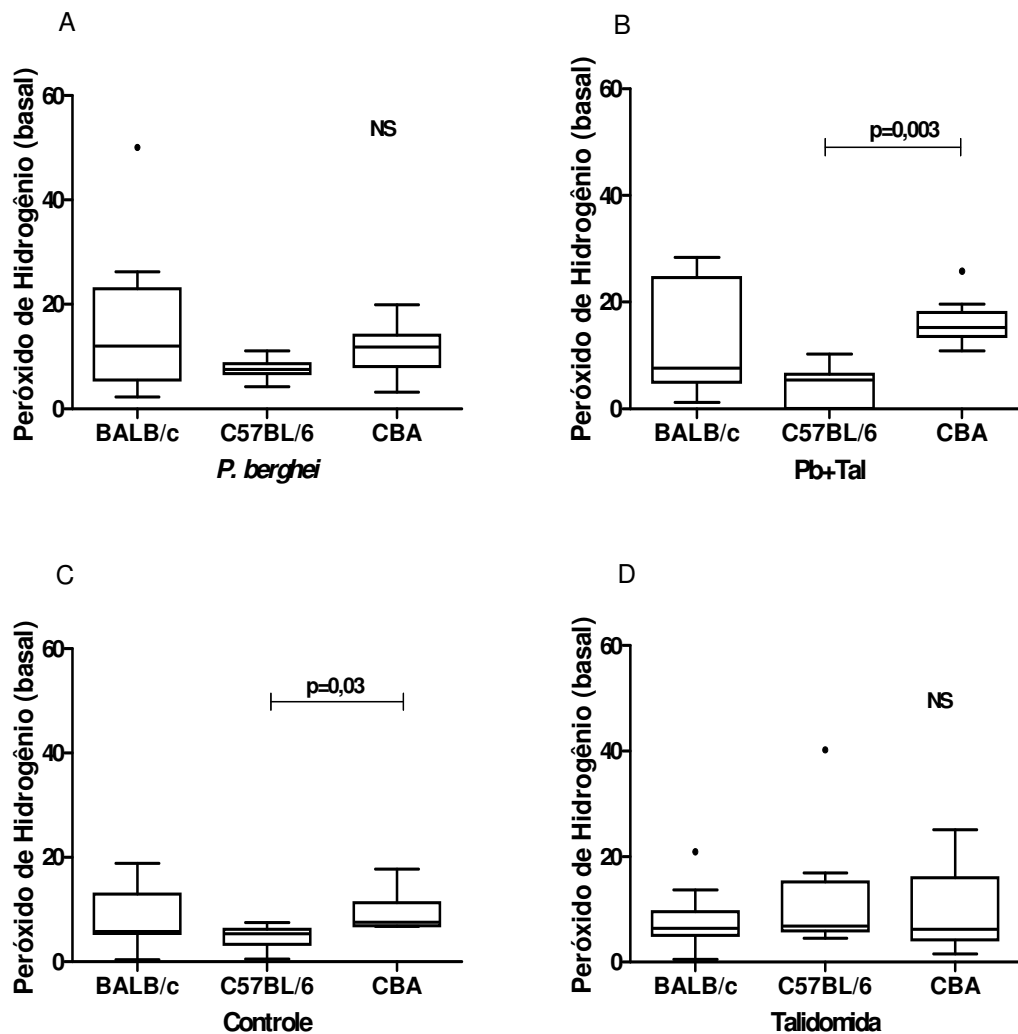


Figura 14. Produção de peróxido de hidrogênio basal, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). 1) Não houve diferença estatística na produção do peróxido de hidrogênio basal entre os diferentes modelos de camundongos infectados (Pb) e os tratados com talidomida(Tal). 2) Os camundongos CBA infectados e tratados com a Tal (Pb+Tal) produziram maior quantidade de peróxido de hidrogênio do que os animais C57BL/6 ($p=0,003$, Kruskal-Wallis, $CBA > C57BL/6$ pelo método de Dunn). 3) A produção de peróxido de hidrogênio pelos camundongos CBA não infectados tratados com salina foi maior do que os C57BL/6 ($p=0,03$, Kruskal-Wallis, $CBA > C57BL/6$ pelo método de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os pontos *outliers* estão representados.

b. Produção de peróxido de hidrogênio estimulada com PMA

Quando os macrófagos foram estimulados *in vitro* com 20 nM de PMA, observamos que os camundongos C57BL/6 infectados pelo *P. berghei* AnKA produziram menor quantidade de peróxido de hidrogênio do que os camundongos CBA e BALB/c. Houve produção 1,9 vezes maior de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos da linhagem BALB/c infectada pelo plasmódio (Pb) ($14,7 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$) em relação aos animais C57BL/6 ($7,71 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$) ($p=0,01$, Kruskal-Wallis, BALB/c>C57BL/6 pelo método de Dunn). **Figura 15 A**. O mesmo ocorreu para os animais do grupo controle e para os animais infectados e tratados com a talidomida. **Figuras 15 C, B**.

Para os animais tratados com talidomida não houve diferença estatística na produção de peróxido de hidrogênio entre as três linhagens (**Figura 15 D**).

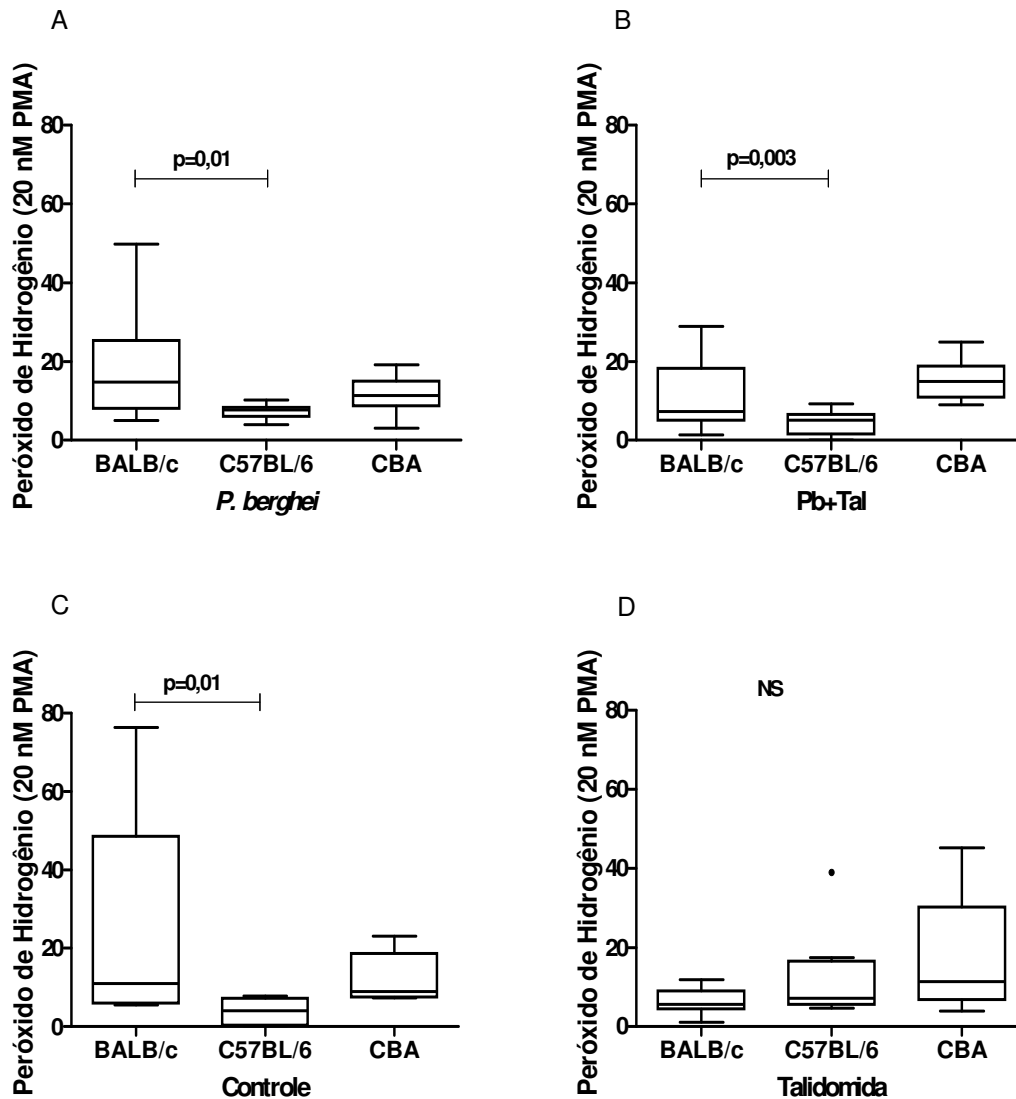


Figura 15. Produção de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com 20 nM PMA, obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9% (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). 1) Os camundongos BALB/c infectados (Pb) produziram maior quantidade de peróxido de hidrogênio do que o modelo C57BL/6 ($p=0,01$, Kruskal-Wallis, BALB/c>C57BL/6 pelo método de Dunn). 2) O mesmo ocorreu com os infectados e tratados com talidomida (Pb+Tal) em que foi maior a produção do peróxido pelos animais BALB/c do que nos animais C57BL/6 ($p=0,03$ teste Kruskal-Wallis, BALB/c>C57BL/6 pelo método de Dunn), assim como nos controles ($p=0,01$ teste Kruskal-Wallis, BALB/c>C57BL/6 pelo método de Dunn). 3) Não houve diferença estatística na produção do peróxido de hidrogênio basal entre os diferentes modelos de camundongos tratados com talidomida. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os pontos *outliers* estão representados.

Utilizando PMA na concentração de 100 nM, um padrão de resposta semelhante foi observado, com os camundongos da linhagem CBA produzindo maior quantidade deste radical do que os camundongos da linhagem C57BL/6.

Figura 16 B,C.

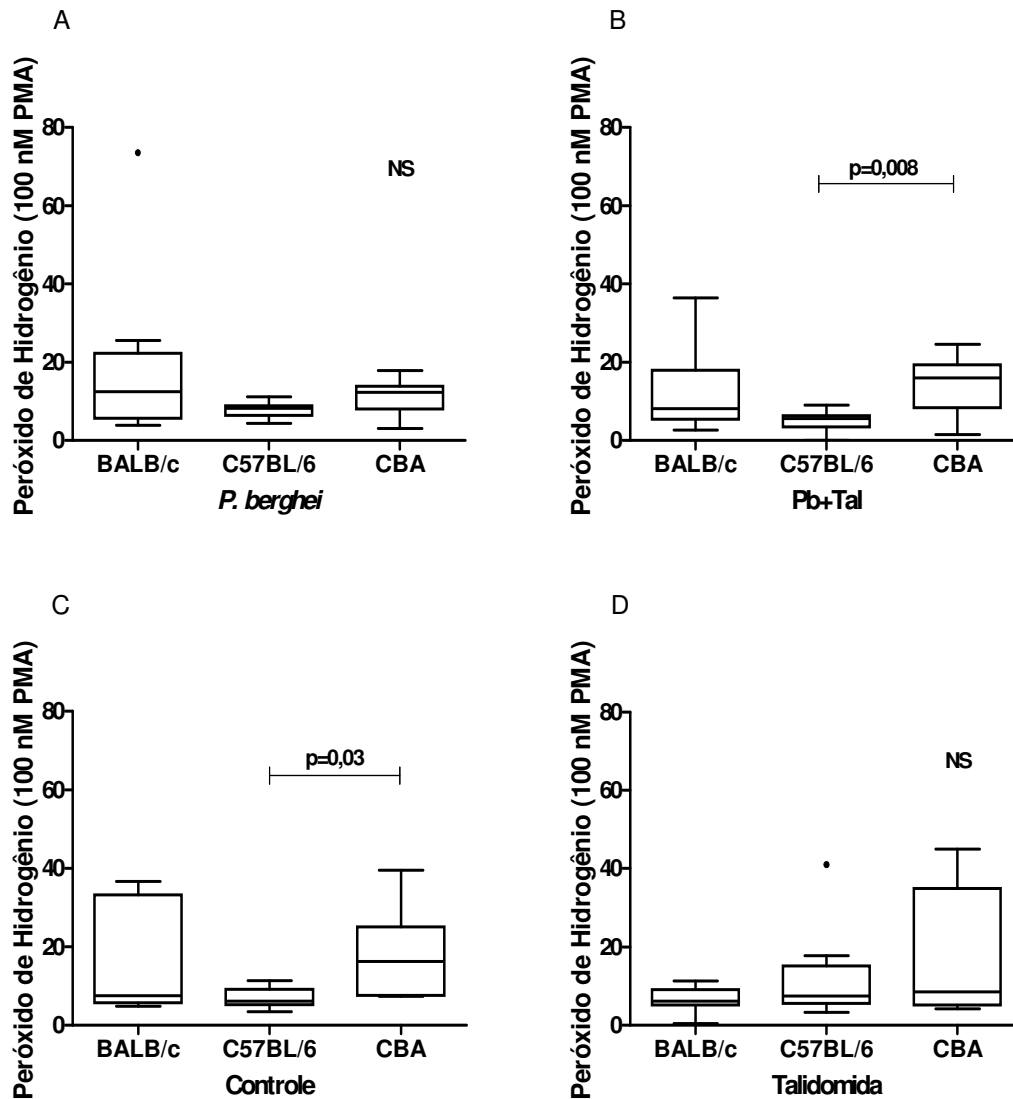


Figura 16. Produção de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com 100 nM PMA, obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9% (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). 1) Não houve diferença estatística na produção do peróxido de hidrogênio entre os diferentes modelos de camundongos infectados (Pb), assim como nos tratados com a talidomida (Tal). 2) Os camundongos CBA infectados e tratados com a Tal (Pb+Tal) produziram maior quantidade de peróxido de hidrogênio do que os C57BL/6 ($p=0,008$ teste Kruskal-Wallis, $CBA > C57BL/6$ pelo método de Dunn). 3) A produção de peróxido de hidrogênio pelos camundongos CBA controle também foi maior que a dos animais C57BL/6 ($p=0,03$ teste Kruskal-Wallis, $CBA > C57BL/6$ pelo método de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os pontos *outliers* estão representados.

Mas nos animais infectados e tratados com talidomida a produção de H_2O_2 pelos animais CBA ($15,9 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$) foi 2,8 vezes maior do que os C57BL/6, ($p=0,008$ teste Kruskal-Wallis, CBA>C57BL/6 pelo método de Dunn). **Figura 16 B.**

A diferença na produção de peróxido de hidrogênio entre os animais CBA ($16,2 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$) e C57BL/6 ($6,07 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$) já é observada desde os grupos controles ($p=0,03$, teste Kruskal-Wallis, CBA>C57BL/6 pelo método de Dunn). **Figura 16 C.**

Não houve diferença estatística entre os modelos na produção do peróxido de hidrogênio para os animais tratados com a talidomida (Tal), assim como nos animais infectados (Pb). **Figura 16 A, D.**

c. Produção de peróxido de hidrogênio estimulada com IFN- γ

Quando foi utilizado o interferon- γ como estímulo dos macrófagos *in vitro*, verificamos um padrão de resposta semelhante aos anteriores para os animais infectados e tratados com a talidomida, havendo diferença entre ambos os modelos susceptíveis à malária cerebral, com os camundongos CBA produzindo maior quantidade de peróxido de hidrogênio que os camundongos C57BL/6.

Para os camundongos infectados e tratados com a talidomida (Pb+Tal), os camundongos CBA ($16,1 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$) produziram 3,5 vezes mais peróxido de hidrogênio do que os camundongos C57BL/6 ($4,52 \mu M H_2O_2/1,5 \times 10^5 M\emptyset/h$) ($p=0,003$, teste Kruskal-Wallis, CBA>C57BL/6 pelo método de Dunn). **Figura 17 B.**

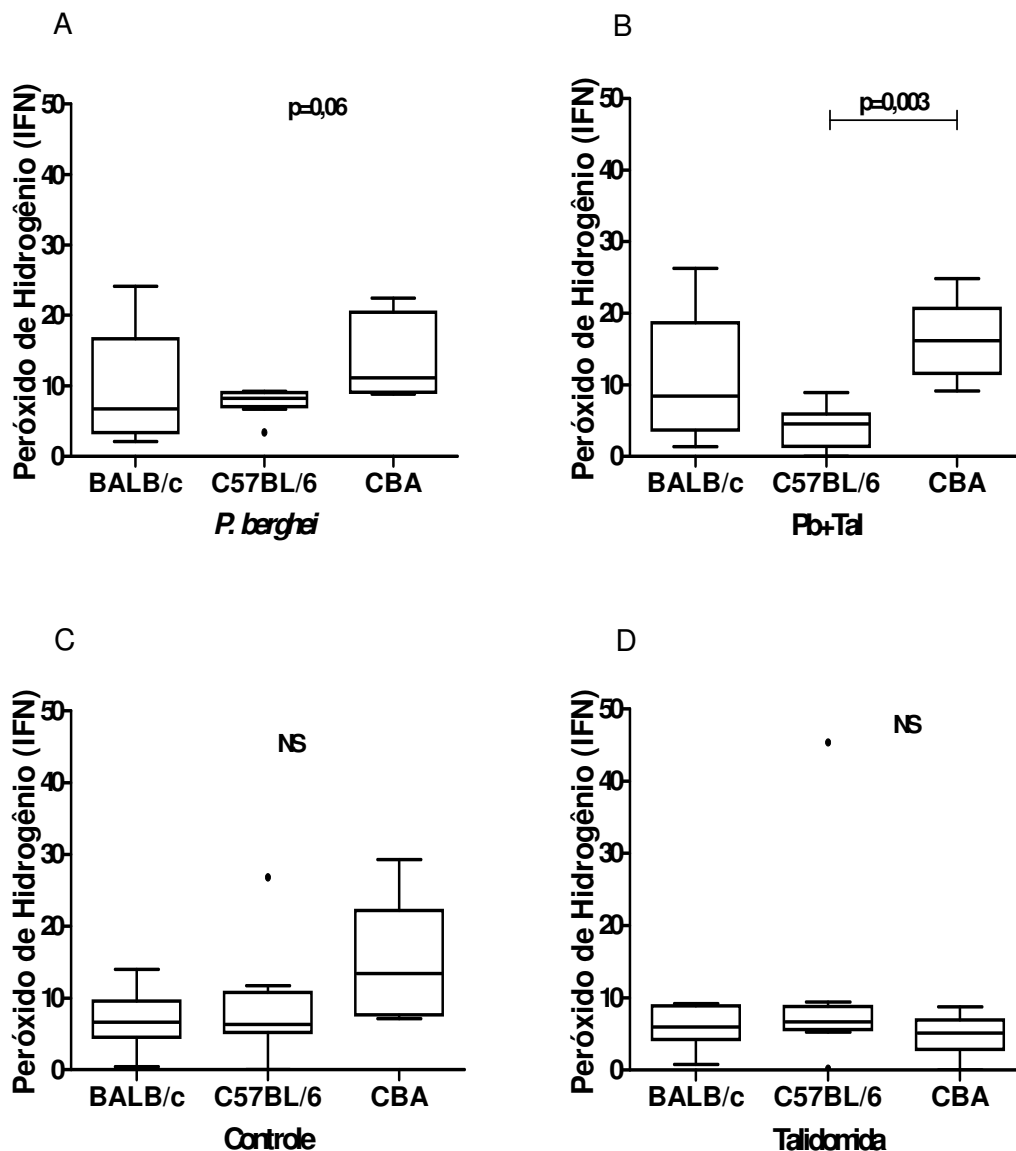


Figura 17. Produção de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com IFN- γ , obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9% (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka e tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal). 1) A produção de peróxido de hidrogênio pelos camundongos CBA infectados e tratados com a Tal (Pb+Tal) foi maior do que os camundongos C57BL/6 ($p=0,003$, teste Kruskal-Wallis, CBA>C57BL/6 pelo método de Dunn). 2) Não houve diferença estatística na produção do peróxido de hidrogênio basal para os outros tratamentos dos diferentes modelos de camundongos pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os pontos *outliers* estão representados.

Para os grupos controles, infectados pelo *P. berghei* e para os tratados com talidomida não se observou diferença estatisticamente significativa na produção do peróxido de hidrogênio. **Figuras 17 A,C,D.**

4.c. PARASITEMIA

4.c.1 Influência da talidomida sobre a parasitemia em camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção com o *Plasmodium berghei* Anka

Para avaliar a carga parasitária nos modelos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) à malária cerebral foi determinada a parasitemia no mesmo dia em que foi analisada a produção dos radicais livres.

A. Comparação entre os grupos de tratamento

Para avaliar a influência do tratamento com a talidomida administrada por via oral a partir do segundo ao oitavo dia de infecção sobre a parasitemia em animais infectados pelo *Plasmodium berghei* Anka foram comparados os grupos Infectados (Pb) e Infectados tratados com talidomida (Pb+Tal) isoladamente para cada modelo animal estudado.

A talidomida não foi capaz de modificar a parasitemia tanto no modelo não susceptível à malária cerebral BALB/c ($p=0,57$, teste t) (**Figura 18 A**), como nos modelos susceptíveis à malária cerebral, sendo o valor do $p=0,92$, teste t para o modelo C57BL/6 (**Figura 18 B**) e $p=0,23$ teste t para os camundongos CBA. (**Figura 18 C**).

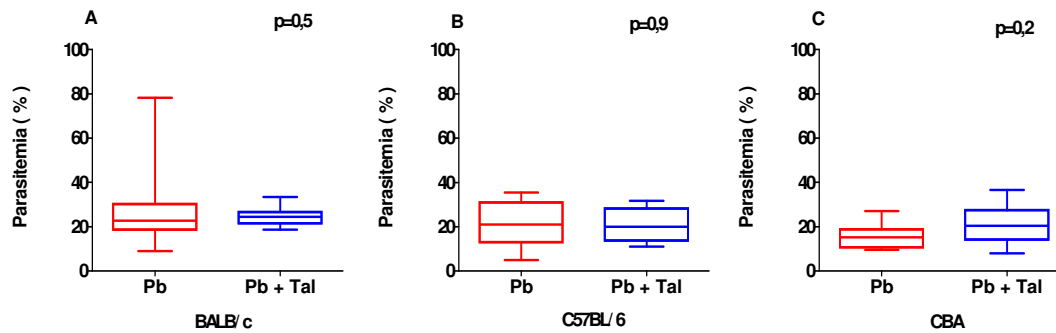


Figura 18. Influência da talidomida sobre a parasitemia (%) dos camundongos susceptíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral infectados intraperitonealmente com 10^6 hemácias parasitadas pelo *Plasmodium berghei Anka* e tratados por via oral a partir do segundo ao oitavo dia de infecção com NaCl 0,9% (Pb) e com 150mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal). Não houve diferença estatística na parasitemia entre os diferentes grupos dos três modelos ($p > 0,05$ pelo teste t).

B. Comparação entre os modelos animais

Com o objetivo de melhor caracterizar a carga parasitária dos três modelos de camundongos de diferentes bases genéticas, comparamos a parasitemia após o tratamento com talidomida entre os três modelos animais.

E ao se avaliar comparativamente a parasitemia nos três modelos de camundongos infectados também não foi possível detectar diferença estatística significativa ($p=0,132$, teste Kruskal-Wallis). **(Figura 19 A)**. Na análise das três linhagens infectadas e tratadas com talidomida igualmente não se constatou diferença estatística entre as parasitemias ($p=0,41$, teste Kruskal-Wallis) **(Figura 19 B)**.

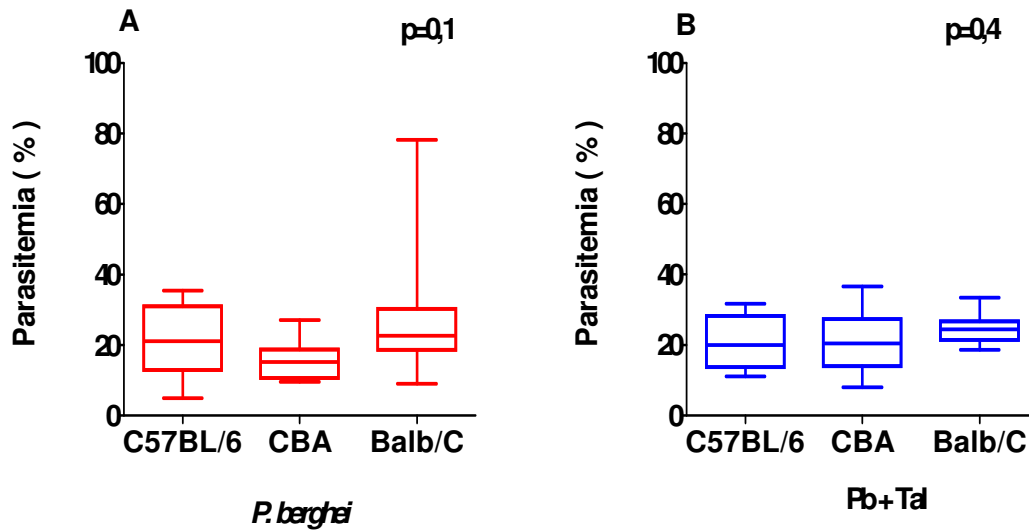


Figura 19. Influência da talidomida sobre a parasitemia (%) dos camundongos susceptíveis (CBA e C57BL/6) ou não (Balb/C) à malária cerebral infectados intraperitonealmente com 10^6 de hemácias parasitadas pelo *Plasmodium berghei* Anka e tratados por via oral a partir do segundo ao oitavo dia de infecção com NaCl 0,9% (Pb) e com 150mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal). Não houve diferença estatística na parasitemia entre as linhagens tratadas ou não com a talidomida ($p>0,05$, teste Kruskal-Wallis).

5. DISCUSSÃO

Embora a malária seja uma das doenças infecto-parasitária das mais estudadas, ainda há muito para esclarecer, particularmente sobre os seus aspectos imunofisiopatogênicos.

Na tentativa de entender melhor a doença, vem sendo utilizado modelos animais, principalmente camundongos, que associado às diferentes espécies de plasmódios murino têm procurado nos elucidar os mecanismos envolvidos nas formas grave da malária, pois mimetizam algumas complicações da doença humana, como a forma cerebral e anemia grave da doença (PLAYFAIR et al., 1977; DOCKRELL et al., 1983; AMANI et al., 1998; HEARN et al., 2000; LOU et al., 2001).

Com o objetivo de compreender um pouco mais os mecanismos envolvidos na determinação das formas graves da doença, neste trabalho foram utilizados os modelos C57BL/6 e CBA, ambos susceptíveis à malária cerebral e o camundongo BALB/C, que não apresenta malária cerebral, mas apresenta anemia grave, quando infectado com a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (LOU et al., 2001). A talidomida tem sido proposta como uma droga de uso potencial para prevenção das formas graves da malária (MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2005; 2001), pelo fato de ter aumentado a sobrevivência de camundongos CBA infectados com o *Plasmodium berghei* Anka, associado a modificações em vários parâmetros imunológicos e histopatológicos (SILVA, 2002; MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2005). Por isso, procuramos compreender melhor sua ação sobre a produção de radicais livres (H_2O_2 e NO), cuja participação é referida nos mecanismos imunopatogênicos nas formas graves

da doença, nestas três linhagens de camundongos que são considerados modelos da doença.

Neste trabalho, os camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA foram infectados com o *Plasmodium berghei* Anka e tratados com 150 mg/Kg/dia de talidomida, por via oral. Esta dose foi utilizada por ter sido observado ser efetiva em estudos anteriores (HAUSCHILD et al., 1997; MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2005). A administração ocorreu do segundo ao oitavo dia, porque, segundo SAMPAIO et al. (1991); LOKENSGARD et al. (2000) e DENG et al. (2003), a droga inibe a produção do fator de necrose tumoral e esta citocina faz parte dos mecanismos de defesa antiplasmódio (MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2001; 2005; 2007), e foi sugerido que sua utilização muito precoce poderia impedir a ação antiparasitária exercida pelo fator necrose tumoral (MUNIZ-JUNQUEIRA, 2007), que é importante para a destruição do parasito (MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2001). Foi escolhido entre o sexto e o oitavo dia para a análise da produção dos radicais livres, pois foi verificado que é o período que os animais dos modelos C57BL/6 e CBA começam a morrer, 2-3 animais por dia com malária cerebral (MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2005).

Com a finalidade de verificar se o tratamento com talidomida influencia diferentemente a resposta do sistema de defesa antiplasmódio nas três linhagens de camundongos, avaliamos comparativamente a produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e a parasitemia nestes três modelos.

Observamos que a produção dos reativos de hidrogênio e nitrogênio foi bastante heterogênea entre os três modelos. Destacamos que o modelo BALB/c manteve a produção basal tanto de óxido nítrico como de peróxido de hidrogênio mais estável, com pequenas variações tanto após a infecção, como

após o tratamento. Enquanto que os outros dois modelos de malária cerebral (camundongos C57BL/6 e CBA) apresentaram respostas opostas. Enquanto o modelo C57BL/6 respondeu à infecção e ao tratamento com a talidomida após a infecção diminuindo a produção de óxido nítrico, os camundongos da linhagem CBA responderam de forma oposta, aumentando a produção do NO, tanto após a infecção como após o tratamento com a talidomida (figuras 6 A e B). Resultados semelhantes foram observados para a produção basal do peróxido de hidrogênio (figuras 14 A e B). Porém, a talidomida não foi capaz de modificar a parasitemia em nenhum dos três modelos infectados com o *Plasmodium berghei* Anka até o oitavo dia da infecção.

Nossos resultados mostraram que a produção basal do óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA (Figuras 6A e 14 A) foi maior do que a dos camundongos CBA e C57BL/6. SYARIFAH et al. (2003) comparou os modelos BALB/c e C57BL/6 e observou maior produção de óxido nítrico e de citocinas, como o fator de necrose tumoral e interferon- γ em sobrenadante de cultura de células esplênicas obtidas dos camundongos BALB/c, detectada do segundo ao oitavo dia após a infecção. Observação também constatada por MARTINS et al. (2009) e TABANEZ (2005), que os camundongos BALB/c, resistentes à malária cerebral, apresentaram maior produção de NO que os animais susceptíveis CBA. Estes resultados sugerem que em seu nível basal, os animais resistentes à forma cerebral já estavam produzindo maior quantidade do NO, molécula que participa dos mecanismos microbicidas contra o plasmódio, ao contrário do que foi observado nos animais C57BL/6. Este dado sugere maior ativação macrofágica pela resposta imune inata, o que pode ser

reforçada pela observação de esplenomegalia, com alargamento da polpa vermelha e branca (HELEGBE et al., 2010) e que reflete também na resposta imunitária adquirida, nos camundongos resistentes à malária cerebral.

Entretanto, embora tenha havido maior produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico nos animais infectados pelo plasmódio, isto não ocasionou diminuição correspondente da parasitemia nestes animais, que mostraram valor semelhante ao observado nos modelos susceptíveis à forma cerebral (C57BL/6 e CBA), (Figura 18A), indicando que o mecanismo protetor da forma cerebral nos animais BALB/c não foi a diminuição da carga parasitária. SYARIFAH et al. (2003) demonstraram que tanto os camundongos BALB/c como os C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA podem induzir a expressão de quimiocinas, tanto no cérebro como no fígado, nas primeiras horas da infecção. Porém, este aumento não se acompanha inicialmente de maior infiltração de leucócitos, mas sim de redistribuição da micróglia para a área perivascular do cérebro e maior respostas destas para as quimiocinas e citocinas no parênquima cerebral da linhagem susceptível à malária cerebral. Isto pode causar danos neuronais assim como sintomas clínicos, conduzindo sequencialmente à imunopatogênese da malária cerebral, com a adesão de monócitos e sequestro nos capilares, e a partir do desencadear deste processo, menor importância se ajuiza à parasitemia. Os mecanismos de lesão dependentes do óxido nítrico envolvidos na imunopatogenia da malária cerebral não estão esclarecidos, mas como nossos dados mostraram que os modelos que fazem malária cerebral apresentaram respostas opostas quanto a produção do NO, possivelmente, mecanismos

diferentes, tanto devidos à falta como ao excesso deste radical, podem estar envolvidos nas formas graves da doença.

Uma possibilidade para explicar a protecção dos animais BALB/c que tem sido sugerida, seria o fato de que no fígado destes animais não há aumento precoce da expressão do mRNA RANTES e da proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), contrariamente ao que acontece no fígado dos camundongos C57BL/6, assim como, no homem infectado pelo *Plasmodium falciparum*. Uma disfunção hepática poderia contribuir para os sintomas cerebrais (REST, 1982; RODRIGUEZ-ACOSTA et al., 1998) devido ao aumento de substâncias lesivas ao cérebro, o que não ocorre no camundongo resistente à forma cerebral da malária.

Em nosso trabalho observamos, que os camundongos BALB/c do grupo controle apresentaram uma produção basal de óxido nítrico intermediária entre os outros dois modelos, sendo superior ao dos animais CBA, mas inferior aos dos animais C57BL/6. Já nos animais infectados pelo plasmódio, a produção do NO foi maior nos animais BALB/c do que nos outros dois grupos (Figura 2A). Nossos dados são semelhantes aos observados por TABANEZ (2005), que mostrou maior produção de NO pelos animais infectados. Essa diferença na produção basal de NO pode ser um dos fatores que determina apresentações clínicas diferentes por influenciar na imunofisiopatogenia da anemia que ocorre mais tardiamente nos camundongos BALB/c (TABANEZ, 2005), já que estudos relatam que a anemia tem sido considerada como manifestação conseqüente ao aumento na produção do óxido nítrico (GYAN et al., 2002). Produção aumentada de nitratos e nitrito por células mononucleares do sangue periférico e aumento da atividade de iNOS (KELLER et al., 2004)

têm sido relatadas correlacionar inversamente com os níveis de hemoglobina (SOBOLEWSKI et al., 2005), e segundo CLARK & COWDEN (2003), na malária pelo *Plasmodium falciparum* os níveis aumentados do óxido nítrico são também responsáveis por produzir deformidades na membrana dos glóbulos vermelhos pela inibição da bomba de sódio e potássio ATPase.

Embora ocorra superprodução de citocinas na malária (LOU et al., 2001), como o fator de necrose tumoral (GRAU et al., 1987; 1989), que induzem a produção de óxido nítrico, ainda é controverso se este radical contribui ou não para a patogênese da malária (ANSTEY et al., 1999; CLARK et al., 2003; NAHREVANIAN, 2006), como também o seu mecanismo de ação durante a doença (SOBOLEWSKI, 2005).

Nos nossos modelos experimentais BALB/c, C57BL/6 e CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, tanto a produção basal do NO como após os estímulos *in vitro* com lipopolissacarídeos e/ou interferon- γ (Figuras 7A, 8A e 9A), a produção de óxido nítrico pelos macrófagos dos animais BALB/c foi maior em relação aos outros dois modelos, ao contrário do que foi encontrado por BORGES (2006), que utilizou macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e CBA e os mesmos estímulos. Segundo STEVENSOM et al. (1995), estes estímulos são capazes de estimular a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio pela ativação de monócitos, macrófagos, células NK e Linfócitos T CD4.

Os camundongos C57BL/6 infectados estimulados com PMA e interferon- γ não produziram mais peróxido de hidrogênio do que os camundongos CBA (Figuras 15A, 16A e 17A). Nossas observações foram diferentes das de STEVENSOM et al. (1992), que mostraram que

camundongos C57BL/6 infectados pelo *P. chabaudi* AS apresentaram no sobrenadante de macrófagos peritoneais e esplênicos aumento significativo de peróxido de hidrogênio no sétimo dia após a infecção, com decréscimo na produção entre o décimo e o décimo quarto dias, permanecendo assim até vigésimo oitavo dia com diminuição da parasitemia. Esta diferença pode ter sido devida às diferentes cepas de plasmódios utilizadas, sugerindo que além das características genéticas do hospedeiro, as características genéticas da cepa também devem influenciar na produção dos radicais livres.

Tem sido sugerido que a talidomida inibe a produção do FNT por aumentar a taxa de degradação do mRNA do FNT. O tratamento com a talidomida dos camundongos CBA mostraram aumento na produção do NO e H₂O₂, ao contrario do modelo C57BL/6 (Figuras 6, 7, 14, 15, 16, 17 B). Nossos dados foram semelhantes àqueles observados por MUNIZ-JUNQUEIRA et al. (2005), que também mostraram que o tratamento com talidomida dos camundongos CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA ocasionou maior produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. O aumento da produção dos radicais de oxigênio e nitrogênio foi paralelo ao aumento da sobrevivência destes animais tratados com a talidomida, sugerindo que este aumento foi benéfico para evolução da doença. Diferentemente, tem sido sugerido que em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA, o tratamento com a talidomida não influenciou a sobrevivência dos animais infectados (GOLENSER et al., 2006). De fato, observamos resultados diferentes na produção dos radicais de oxigênio e nitrogênio dos camundongos C57BL/6 em relação ao CBA. Nos camundongos C57BL/6 a talidomida modulou negativamente a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio,

enquanto nos animais CBA a talidomida modulou positivamente a produção destes radicais. No entanto, se este efeito imunoprotetor nos camundongos CBA foi devido ao aumento do NO e/ou do peróxido de hidrogênio ou a outro efeito imunomodulador da talidomida não pode ainda ser afirmado. Contudo, o aumento na produção dos radicais de oxigênio e nitrogênio nestes animais, pode ter sido pela capacidade da talidomida aumentar a expressão de moléculas CD40 nos linfócitos T e assim estimular a fagocitose pelos macrófagos, que apresentam um papel importante na defesa contra o plasmódio, e igualmente pelo fato da talidomida também poder agir como sinal co-estimulatório nas células T aumentando a expressão de interferon- γ e interleucina-2 (CORRAL & KAPLAN, 1999).

As interações entre o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio podem produzir produtos de peroxidação lipídica, que tem sido mostrado estarem aumentados na malária e estão igualmente envolvidos tanto na patogênese como na proteção contra o parasito da malária (ROCKETT et al., 1988; DAS et al., 1993). O *Plasmodium berghei* e o *Plasmodium yoelli* letais e não-letais foram mortos *in vitro* pelo peróxido de hidrogênio (DOCKRELL et al., 1983).

Não houve diferença na parasitemia entre os animais BALB/c, C57BL/6 e CBA infectados e tratados com talidomida em relação aos animais infectados e tratados com salina (Figuras 19 A e B), assim como foi constatado previamente, MUNIZ-JUNQUEIRA et al. (2005) não observaram diferenças nos resultados da carga parasitária nos animais tratados e não tratados com a talidomida. Isto sugere que a droga afetou principalmente a função do sistema imunitário e a imunofisiopatogenia da doença malárica, possivelmente pela modulação da expressão das moléculas de adesão (ZWINGENBERGER et al.,

1996), todavia não tendo nenhum efeito antiparasitário direto. Estas observações são consistentes com as indicações de que não obstante a talidomida modular a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, estes não foram capazes de combater a multiplicação do parasita na infecção pelo *Plasmodium berghei*, sendo necessárias outras respostas imunes para o controle da parasitemia (TAYLOR-ROBINSON, 1999; BRINKMANN et al,1984), como também o uso de drogas antiparasitárias que atuem diretamente nas diferentes etapas do ciclo de vida do plasmódio (FRANÇA et al., 2008), permitindo o rápido *clearance* do parasita. Estes parâmetros reforçam que a talidomida deve ser utilizada como droga complementar ao tratamento antiparasitário.

Ao analisar os modelos susceptíveis à malária cerebral, verificamos aumento na produção de óxido nítrico pelos animais C57BL/6 não infectados tratados com talidomida (Figuras 6, 7, 9 D), salientando que o acréscimo na produção de óxido nítrico pelos macrófagos dos camundongos deveu-se também à ação imunomoduladora do medicamento sobre o sistema imunitário (MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2005).

Em nosso trabalho observamos diferenças nas produções dos radicais de hidrogênio e nitrogênio entre as duas linhagens susceptíveis à malária cerebral (CBA e C57BL/6), principalmente entre os infectados e os infectados tratados com a talidomida (Figuras 2 B e 2C; 10 B e C; 11 B e C; 12 B e C; 13 B e C). Os camundongos CBA responderam ao tratamento com a talidomida aumentando a produção dos dois radicais, o que SILVA (2002) também demonstrou para camundongos CBA tratados com talidomida. É possível que um dos mecanismos de ação da talidomida tenha sido a inibição da produção

do FNT- α pelos macrófagos, possivelmente de uma maneira mais pronunciada nos animais C57BL/6, pois diminuíram a produção do NO que é estimulada pelo FNT- α . Diferente produção de radicais livres ocorreu também entre os animais infectados não tratados, sugerindo que devem existir características genéticas específicas importantes que podem interferir nas respostas de cada linhagem. Embora as duas linhagens sejam susceptíveis ao acometimento cerebral, o fator determinante da susceptibilidade deve ser diferente nos dois modelos. De fato, RANDALL et al. (2008) trabalhando com camundongos susceptíveis à malária cerebral das cepas C57BL/6 e CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA mostrou, pela extração de RNA de células de tecido cerebral e pelo nível sérico de citocinas, significativa heterogeneidade nas respostas entre as duas cepas. Têm sido mapeados diferenças na expressão de alguns genes dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6, considerados como determinantes da malária cerebral, como heme oxigenase 1 (*hmx1*) (PAMPLONA et al., 2007) CXCL10 (yIP-10) (HANSEN et al., 2007; MIU et al., 2008) e granzima A e B produzidos pelas células T CD8 citotóxicos (YANEZ et al., 1996; BELNOUE et al., 2002; POTTER et al., 2006). Tem sido sugerido que os camundongos CBA têm uma atividade imunológica global maior que os animais C57BL/6. Todavia ambos tiveram aumento dos níveis de mRNAs codificando as citocinas FNT e linfotóxina alfa (LT- α) e seus receptores no tecido cerebral. Contudo, os níveis de mRNA de TNF e de LT- α diferiu entre as duas linhagens de camundongos após infecção por *P. berghei* ANKA (RANDALL et al., 2008). Houve um aumento relativo da expressão dos níveis de mRNA do TNF nos cérebros dos camundongos CBA (RAE et al., 2004) ao contrário do que ocorreu nos camundongos C57BL/6, no qual se observou

aumento dos níveis de mRNA da LT- α (RANDALL et al., 2008), diferenças na produção das citocinas também constatada por outros autores (GRAU et al., 1987; ENGWERDA et al., 2002).

Encontramos diferença na produção do peróxido de hidrogênio, tanto na produção basal como após os estimulados com PMA 20 e 100 nM, entre o grupo controle do modelo CBA e o grupo controle dos camundongos C57BL/6 (Figuras 14, 15, 16, 17C), não obstante, BORGES (2006) não encontrou alteração na produção basal ou estimulada dos animais CBA. O aumento da produção basal de H₂O₂ pode ser devido à maior atividade imunológica destes animais, pois segundo RANDALL et al. (2008), os animais CBA não infectados apresentam número aumentado de células TCD4 no cérebro, diferentemente dos camundongos C57BL/6, no qual se verifica este aumento no número de linfócitos no cérebro somente durante a doença neste órgão.

Pelo conjunto de nossas observações, não houve modificação da parasitemia dos camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados com talidomida, como também não houve alteração importante na produção basal do NO e do H₂O₂ por estes animais na vigência da infecção ou do tratamento, sendo que os valores destes radicais permaneceram mais homogêneos. A produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* foi menor do que a dos camundongos CBA e quando tratados com talidomida, os animais C57BL/6 modularam negativamente esta produção. Enquanto que para os camundongos CBA, os animais do grupo controle apresentaram maior produção de peróxido de hidrogênio do que os camundongos C57BL/6, tanto

os infectados com *Plasmodium berghei* Anka como os infectados e tratados com talidomida.

Nossos dados contribuíram para esclarecer as diferenças na produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio entre as três linhagens de camundongos infectados pelo mesmo plasmódio. A observação de que em nenhum dos modelos, seja aumentando ou diminuindo a produção destes radicais livres, houve modificação da parasitemia, sugere que outros fatores são necessários para a defesa parasitária, além destes dois mecanismos microbicidas. Nossos dados mostraram que, embora tanto os camundongos CBA como os C57BL/6 apresentem a clínica de malária cerebral, as repostas quanto à produção de radicais livres foram opostas entre os dois modelos ao mesmo estímulo, infecção e tratamento com a talidomida, e possivelmente foram decorrentes de diferenças de respostas dependentes de sua base genética, desde que as condições experimentais de estímulo infeccioso foram semelhantes, utilizando o mesmo parasita e as mesmas condições experimentais. Nossos dados sugerem também que, como tanto o aumento quanto a diminuição da produção de NO e de H₂O₂ ocorreram nos animais que apresentam a forma cerebral da doença, é provável que eles radicais sejam um fenômeno paralelo, como consequência e não causa da forma cerebral da doença. Ou então, como determinantes de fenômenos opostos, porém responsáveis pelo mesmo efeito final.

Deve ser considerado também que estes radicais livres têm um tempo de vida muito curto, e que não necessariamente a produção aumentada dos radicais livres pelos macrófagos atingirá o seu alvo na hemácia parasitada,

podendo resultar em maior determinação de imunoagressão ao tecido do que defesa antiparasitária.

Outro aspecto que precisa ser considerado é o fato de que a resposta dos camundongos BALB/c, que não apresentam malária cerebral, manteve-se mais homogênea do que a dos outros dois modelos que apresentam a forma cerebral da doença. É possível que o desequilíbrio da resposta, seja pelo aumento ou pela diminuição dos radicais livres é que possa estar contribuindo para a imunopatogenia da doença.

O tratamento com a talidomida dos animais infectados também causou respostas opostas quanto à produção dos radicais livres, seja aumentando ainda mais nos camundongos CBA, diminuindo ainda mais nos camundongos C57BL/6 ou não alterando nos camundongos BALB/c, o perfil inicial de resposta dos animais infectados sem o tratamento. Isto sugere que o efeito da talidomida no indivíduo infectado também depende das características genéticas do indivíduo.

Os nossos dados contribuem para a compreensão de que ocorrem respostas diferentes, tanto à infecção como ao tratamento com a talidomida, em modelos murinos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, dependentes da base genética do indivíduo. Nossas observações sugerem que as respostas individuais ao plasmódio podem ser diferentes, o que aponta para a necessidade de se ter, na prática clínica, marcadores imunológicos e/ou bioquímicos, que nos permitissem diferenciar os indivíduos que poderiam evoluir para as formas graves da doença e mesmo aqueles que poderiam ser beneficiados pela administração de drogas imunomoduladoras, como a

talidomida, como terapia complementar aos antiparasitários, para que pudessem alterar a drástica evolução das formas graves da malária.

6. CONCLUSÕES

1. A produção basal do óxido nítrico pelos macrófagos dos três modelos murinos experimentais estudados, tanto em resposta à infecção como ao tratamento com a talidomida, foi diferente. Enquanto não houve variação significativa entre os grupos dos camundongos BALB/c, os animais C57BL/6 diminuíram a produção do NO após a infecção e o tratamento, e os camundongos CBA apresentaram resposta oposta, aumentando a produção deste radical à infecção e ao tratamento.
2. De uma maneira geral os estímulos com LPS e INF- γ *in vitro* aumentaram a produção do NO pelos macrófagos dos animais estudados. Entretanto, na presença de estímulos com LPS, os animais C57BL/6 e CBA mantiveram o mesmo padrão de resposta, porém em níveis superiores, enquanto que os camundongos BALB/c aumentaram a produção deste radical tanto pela infecção como pelo tratamento.
3. Quando o estímulo foi feito utilizando o INF- γ , os camundongos BALB/c infectados pelo *Plasmodium berghei* Anka produziram mais NO que os outros grupos estudados (Con, Tal, Pb+Tal). Como também produziram mais NO em relação aos animais C57BL/6 e CBA.
4. Quando a produção do NO foi analisada utilizando *in vitro* a associação dos dois estímulos, LPS+INF- γ , os camundongos CBA do grupo controle produziram uma resposta muito mais exacerbada, tanto em relação aos outros grupos (Tal, Pb, Pb+Tal), como em relação aos outros modelos (BALB/c e C57BL/6) estudados.
5. O padrão de resposta basal de produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos foi muito semelhante ao observado para o óxido nítrico.

Enquanto não houve diferença estatística entre os grupos dos animais BALB/c (Con, Tal, Pb, Pb+Tal), houve diminuição da produção do H₂O₂ pelos animais C57BL/6 infectados e pelos infectados e tratados com a talidomida. Entretanto, resposta oposta foi observada para os camundongos CBA, para os quais houve aumento da produção do H₂O₂ tanto pelos camundongos infectados pelo plasmódio como pelos infectados e tratados com a talidomida.

6. Após o estímulo com 20 nM PMA, os animais BALB/c mostraram maior variabilidade de resposta.
7. Após estímulo com 100 nM PMA, houve diferença de resposta entre os modelos C57BL/6 e CBA.
8. O tratamento com a talidomida não influenciou a parasitemia em nenhum dos três modelos estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla SH, Wickramasinghe SN. The study of erythroid progenitor cells in the Gambian children with falciparum malaria. Clin Lab Haematol 1988; 10: 33-40.

Akira S. TLR signaling. Curr Top Microbiol Immunol 2006; 311: 1–16.

Amani V, Boubou MI, Pied S, Marussig M, Walliker D, Mazier D, et al. Cloned lines of *Plasmodium berghei* ANKA differ in their abilities to induce experimental cerebral malaria. Infect Immun 1998; 66: 4093–4099.

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

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

Anstey MN, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, et al. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. J Exp Med 1996; 184: 557-567.

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

Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin JC, Van Rooijen N, Viguier M, et al. On the pathogenic role of brain-sequestered CD8 T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2002; 169: 6369–6375.

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

Borges TKS. Influência da pentoxifilina sobre a infecção murina por *Plasmodium berghei* ANKA em modelos susceptíveis ou não à malária cerebral. Tese de mestrado, Brasília (DF). Universidade de Brasília 2006.

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

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

Calabrese L, Fleischer AB. Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am J Med* 2000; 108: 487-495.

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

Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 439-450.

Clark IA, Rockett KA, Cowden WB. Proposed link between cytokines, nitric acid and human cerebral malaria. Parasitol Today 1991; 7: 205- 207.

Clark IA, Cowden WB, Butcher GA, Hunt NH. Possible roles of tumor necrosis factor in the pathology of malaria. Am J Pathol 1987; 129: 192-199.

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

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

Corral LG, Kaplan G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. Ann Rheum Dis 1999; 58: 107-113.

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

Das BS, Patnaik JK, Mohanty S, Mishra SK, Mohanty D, Satpathy SK, et al. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 1993; 49: 720-725.

de Kossodo S, Grau GE. Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J Immunol* 1993; 151: 4811-20.

de Souza JB, Hafalla JC, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* 2010; 137:755-72

Deng L, Ding W, Granstein RD. Thalidomide inhibits the production of tumor necrosis factor- α and antigen presentation by Langerhans cells. *J Invest. Dermatol* 2003; 121: 1060-1065.

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

Dondorf AM, Pongponratn E, White NJ. Reduced microcirculation flow in severe falciparum malaria. *Acta Trop* 2004; 89: 309-317.

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

Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol* 2005; 21: 75-80.

Engwerda CR, Mynott TL, Sawhney S, de Souza JB, Bickle QD, Kaye PM. Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor

alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med* 2002; 195: 1371–1377.

Ferguson MA, Brimacombe JS, Brown JR, Crossman A, Dix A, Field RA, et al. The GPI biosynthetic pathway as a therapeutic target for African sleeping sickness. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 327-340.

Fink MP. Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organs dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin* 2001; 17: 219- 237.

França TCC, dos Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quim Nova* 2008; 31: 1271-1278.

Franklin BS, Rodrigues SO, Antonelli LR, Oliveira RV, Goncalves AM, Sales-Junior PA, et al. 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* 2007; 9: 881–890.

Golenser J, Mcquillan J, Hee L, Mitchell AJ, Hunt N. Conventional and experimental treatment of cerebral malaria. *Internat J Parasitol* 2006; 36: 583-593.

Gowda DC. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol* 2007; 23: 596-604

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

Grau GE, Tacchini-Cottier F, Vesin C, Milon G, Lou JN, Piguet PF, et al. TNF-induced microvascular pathology: active role for platelets and importance of the LFA-1/ICAM-1 interaction. *Eur Cytokine Netw* 1993; 4: 415-419.

Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* 1989; 320: 1586-1591.

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

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

Greenwood B, Targett G. Do we still need a malaria vaccine? *Parasite Immunol* 2009; 31: 582-586.

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

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

Hauschild A, Kroeger H, Mitchison NA, Ugrinovic S, Zwingenberger K. Thalidomide therapy of established collagen-induced arthritis (CIA) not accompanied by an evident Th2 shift. Clin Exp Immunol 1997; 108: 428-431.

Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. Lancet Infect Dis 2004; 4: 327-336.

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

Helegbe GK, Yanagi T, Senba M, Huy NT, Shuaibu MN, Yamazaki A, et al. Histopathological studies in two strains of semi-immune mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA after chronic exposure. Parasitol Res 2010; 108: 807-814.

Ho M, White NJ. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. Am J Physiol Cell Physiol 1999; 276 :C1231-1242.

Hviid L. Clinical disease, immunity and protection against *Plasmodium falciparum* malaria in populations living in endemic areas. *Expert Rev Mol Med* 1998; 1998: 1-10.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci US A* 1987; 84: 9265-9269.

Jennings VM, Actor JK, Lal AA, Hunter RL. Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. *Infect Immun* 1997; 65: 4883–4887.

Jennings VM, Lal AA, Hunter RL. Evidence for multiple pathologic and protective mechanism in murine cerebral malaria. *Infect Immun* 1998; 66: 5972-5979.

Keller CC, Kremsner PG, Hittner JB, Misukonis MA, Weinberg JB, Perkins DJ. Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infect Immun* 2004; 72: 4868–4873.

Kremsner PG, Grudmman H, Neifer S, Sliwa K, Sahlmüller G, Hegenscheid B, et al. Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. *J Infec Diseases* 1991; 164: 605-608.

Kremsner PG, Winkler S, Brandts C, Wilding E, Jenne L, Graninger W, et al. Prediction of accelerated cure in *Plasmodium falciparum* malaria by the elevated capacity of tumor necrosis factor production. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 532.

Kremsner PG, Winkler S, Wilding E, Prada J, Bienzle U, Graninger W, et al. High plasma levels of nitrogen oxide are associated with severe disease and correlated with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 44-47.

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

Kun J F. Regulation of nitrogen monoxide production in human malaria. *Redox Rep* 2003; 8: 289-291.

Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, et al. TNF concentration non-fatal cerebral, plasmodium-fatal cerebral and uncomplicated *falciparum* malaria. *Lancet* 1990; 336: 1201-1204.

Kwiatkowski D, Nowak M. Periodic and chaotic host-parasite interactions in human malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5111- 5113.

Laroux FS, Lefer DJ, Kawachi S, Scalia R, Cockrell AS, Gray L, et al. Role of nitric oxide in the regulation of acute and chronic inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2: 391-396.

Lokensgard JR, Hu S, van Fenema EM, Sheng WS, Peterson PK. Effect of thalidomide on chemokine production by human microglia. *J Infect Dis* 2000; 182: 983-987.

Looareesuwan S, Ho M, Wattanagoon Y, White NJ, Wavrell DA, Bunnaq D, et al. Dynamic alterations in splenic function during acute falciparum malaria. *N Engl J Med* 1987; 317: 675-679.

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

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

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

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

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

Macpherson GG, Warrel MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrel DA. Human cerebral malaria. The quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* 1985; 119: 385–401.

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

Maneerat Y, Viriyavejakul P, Punpoowong B, Jones M, Wilairatana P, Pongponnath E, et al. Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. *Histopathology* 2000; 37: 269-277.

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

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

Martins YC, Smith MJ, Pelajo-Machado M, Werneck GL, Lenzi HL, Daniel-Ribeiro CT, et al. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *Int J Exp Pathol* 2009 90:119–130.

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

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

Miu J, Mitchell AJ, Muller M, Carter SL, Manders PM, Mcquillan JA, et al. Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J. Immunol* 2008; 180: 1217–1230.

Moller DR, Wysocka M, Greenlee BM, Ma X, Wahl L, Flockhart DA, et al. Inhibition of IL-12 production by thalidomide. *J Immunol* 1997; 159: 5157-5161.

Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor- α by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993; 177: 1675-80.

Mukhopadhyay S, Herre J, Brown GD, Gordon S. The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology* 2004; 112: 521–530.

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

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

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

Muniz-Junqueira MI, Tosta CE. Stepwise observations of in vitro phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by human monocytes. *Rev Soc Brasil Med Trop* 2009; 42: 103-106.

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

Mutis MCS, Martinez-Espinosa FE, Albuquerque BC, Coura JR. Malária. Em: Coura JR (Ed) *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Guanabara Koogan (Editora), Rio de Janeiro, Volume I. Capítulo 67, pps 834-835, 2005.

Nahrevanian H. Immune Effector Mechanisms of the Nitric Oxide Pathway in Malaria: Cytotoxicity versus cytoprotection. *Braz J Infect Dis* 2006; 10: 283-292.

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

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

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

Omodeo-Salè F, Motti A, Basilico N, Parapini S, Olliaro P, Taramelli D. Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. *Blood* 2003; 102: 705-711.

Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphanyo S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* 2007; 13: 703–710.

Pessoa SB, Martins AV. *Paraitologia médica*, 9ª edição, 1974, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

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

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

Playfair JHL, de Sousa JB, Cotrell BJ. Protection of mice against malaria by a killed vaccine: differences in effectiveness against *P. yoelii* and *P. berghei*. *Immunology* 1977; 33: 507-515.

Pongponratn E, Turner G, Day NPJ, et al. An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 345-9.

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

Rae C, Mcquillan JA, Parekh SB, Bubb WA, Weiser S, Balcar VJ, et al. Brain gene expression, metabolism, and bioenergetics: interrelationships in murine models of cerebral and noncerebral malaria. *FASEB J* 2004; 18: 499-510.

Ramirez-Villafuertes JM, Oltra-Ramirez A, Favila-Castillo L. The effect of thalidomide on parasitemia, antibody response, anemia and blood glucose in CB6F1 mice infected with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *AS Parasitol* 1998; 47 (Suppl): 346.

Randall LM, Amante FH, Mcsweeney AK, Zhou Y, Stanley AC, Haque A, et al. Common strategies and modulate experimental cerebral malaria in mouse strains with different susceptibilities. *Infect. Immun* 2008; 76: 3312-3320.

Rest JR. Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. *Trans R Soc Trop Hyg* 1982; 76: 410-415.

Rey L. Os plasmódios e a malária: I. Os parasitos. Em: REY L (Ed) *Parasitologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Capítulo 26, pp 336-337, 2001, 3.ed.

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

Rodríguez-Acosta A, Finol HJ, Pulido-méndez M, Márquez A, Andrade G, González N, et al. Liver ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. *J Submicroscop Cytol Pathol* 1998; 30: 299-307.

Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293:1653-1662.

Rudin W, Eugster H-P, Bordmann G, Bonato J, Muller M, Yamage M, et al. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor α / α

deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. *Am J Pathol* 1997; 150: 257-266.

Sabbatini S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). a public health concern? *Braz Infect Dis* 2010; 14: 299-309.

Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JA, Miguel CP, Viana SM, et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis* 1993; 168: 408-414.

Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor-production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991; 173: 699-703.

Sandau KB, Zhou J, Kietzman T, Brune B. Regulation of hypoxia-inducible factor I alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *J Biol Chem* 2001; 276: 39805-39811.

Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 1993; 177: 145-153.

Shaffer N, Grau GE, Hedberg K, Davachi F, Lyamba B, Hightower AW, et al. Tumor necrosis factor and severe malaria. *J Infect Dis* 1991; 163: 96-101

Silva OF. Efeito do tratamento de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* Anka com talidomida sobre a função fagocitária de macrófagos peritoneais, *in vitro*. Tese de mestrado. Brasília (DF). Universidade de Brasília 2002.

Smyth JD. Introduction to animal parasitology. Em: Third edition (Ed) Cambridge University Press, 1994; pp 109 - 136.

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

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

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

Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF, Sher A. IL-12 induced protection against blood stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and INF-alpha and

occurs via a nitric oxide- dependent mechanism. *Journal of Immunology* 1995; 155: 2545-2556.

Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 169-180.

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

Syarifah HP, Masashi H, Somei K. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. *Int Immunol* 2003; 15: 633 - 640.

Tabanez PCR. Influência da talidomida sobre a infecção murina por *Plasmodium berghei* Anka em modelos susceptíveis ou não a malaria cerebral. Tese de mestrado, Brasília (DF). Universidade de Brasília 2005.

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

Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, Mcconville M, Schofield L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium, Trypanosoma, and Leishmania: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 4022-4027.

Taylor-Robinson AW, Smith EC. A Role for cytokines in potentiation of malaria vaccines through immunological modulation of blood stage infection. Immunol Rev 1999; 171: 105 -123.

Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. Am J Pathol 1994; 145: 1057–1069.

Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. J Biomed Biotechnol 2004; 4: 227-237.

van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. Int Immunopharmacol 2001; 1: 1491-500.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death and Differentiation 2003; 10: 45–65.

Weiss G, Thuma PE, Biemba G, Mabeza G, Werner ER, Gordeuk VR. Cerebrospinal fluid levels of biopterin, nitric oxide metabolites, and markers of immune activation and clinical course of human cerebral malaria. *J Infect Dis* 1998; 177: 1064-1068.

Whitworth JA, Hewitt KA. Effect of malaria on HIV-1 progression and transmission. *Lancet* 2005; 365: 196-197.

WHO - World Health Organization Division of Control of Tropical Disease. Severe *P. falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94 (Suppl 1): 1-90.

WHO - World Health Organization. Malaria report [online] 2008 : disponivel em [http : \[capturado em 2010 Out\] www.who. int/malaria/wmr 2008/- 20k.](http://www.who.int/malaria/wmr2008/)

Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Prat Res Clin Haematol* 2000; 13: 277 – 299.

Xie YW, Wolin MS. Role of nitric oxide and its interaction with superoxide in the suppression of cardiac muscle mitochondrial respiration. Involvement in response to hypoxia reoxygenation. *Circulation* 1996; 94: 2580 –2586.

Yanez DM, Manning DD, Cooley AJ, Weidanz WP, van der Heyde HC. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J Immunol* 1996; 157: 1620–1624.

Zwingenberger K, Wnendt S. Immunomodulation by thalidomide, systematic review of the literature and of unpublished observations. *J Inflamm* 1995-96; 46: 177-211.

8. ANEXOS

Anexo 1.

| | |
|---|--|
| | Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal |
| Brasília, 11 de fevereiro de 2011. | |
| DECLARAÇÃO | |
| <p>Declaramos que o projeto intitulado "INFLUÊNCIA DA FILOSSEPTINA 1, DA PENTOXIFILINA, DA PRAVASTATINA, DA TALIDOMIDA E DA DERMOSSEPTINA 01 SOBRE AS VIAS DE ATIVAÇÃO CELULARES ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA MALÁRIA EXPERIMENTAL MURINA.", UnBDOC nº 43050/2010, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.</p> | |
| Prof. Antonio Sebben Coordenador do CEUA | |

9. TABELAS

Tabela 1. Mediana (extremos) da produção de óxido nítrico basal ou estimulada com LPS e/ou INF- γ , *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka, tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal)

| <i>Grupos</i> | <i>Produção Basal</i> | <i>Estimulada com LPS</i> | <i>Estimulada com LPS e INF-γ</i> | <i>Estimulada com INF-γ</i> |
|---------------|-----------------------|-----------------------------------|---|---|
| Controle | 6 (3,2 - 10,2) | 6,6 (0,0 – 14,2) | 7,7 (4,3 – 51,1) | 8,5 (5,8 – 17,0) |
| Tal | 8,3 (4,7- 23,3) | 12,7 (7,0 – 29,1) | 24,8 (5,8 – 45,0) | 8,4 (5,1 – 13,6) |
| Pb | 7,9 (4,3 – 12,1) | 9,77 (7,7 - 39) | 11,4 (5,1 - 94,7) | 19,2 (8,5 - 99,8) ^b |
| Pb+Tal | 6,6 (6 -11,7) | 19,7 (6,0 – 41,3) ^a | 22,5 (7,2 – 143,0) | 11,0 (4,38 - 58,9) |

Anova ou Kruskal – Wallis para a comparação entre os grupos, teste Student Neuman-Keuls e teste Dunn para as múltiplas comparações. ^a Diferença significativa ($p = 0,018$) na comparação do grupo Pb+Tal com o Cont, ^b Diferença significativa ($p = 0,03$) na comparação entre o grupo Pb e o grupo Tal.

Tabela 2. Mediana (extremos) da produção de óxido nítrico basal ou estimulada com LPS e/ou INF- γ , *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, não infectados tratados com NaCl 0,9% (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka, tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal)

| <i>Grupos</i> | <i>Produção Basal</i> | <i>Estimulada com LPS</i> | <i>Estimulada com LPS e INF-γ</i> | <i>Estimulada com INF - γ</i> |
|---------------|---------------------------------|---------------------------|---|---|
| Controle | 10 (4,9 - 21,9) ^a | 22,5 (5,8 – 93,5) | 7,8 (4,9 – 33,6) | 6,9 (5,5 – 26,2) |
| Tal | 6,6 (4,0- 26,5) | 17,1 (5,5 – 69,7) | 9,8 (6,0 – 109,5) | 12,0 (6,6 – 40,7) |
| Pb | 4,9 (4,3 – 6,4) | 10,0 (5,7 – 31,0) | 11,5 (5,5 - 195,3) | 7,6 (4,3 - 27,1) |
| Pb+Tal | 4,9 (1,8 - 7,4) | 6,0 (5,2 – 13,6) | 12,9 (7,2 – 153,2) | 9,4 (4,7 - 16,3) |

Anova ou Kruskal – Wallis para a comparação entre os grupos, teste Student Neuman-Keuls e teste Dunn para as múltiplas comparações. ^a Diferença significativa ($p = 0,020$) na comparação do grupo Cont com o grupo Pb+Tal.

Tabela 3. Mediana (extremos) da produção de óxido nítrico basal ou estimulada com LPS e/ou INF- γ , in vitro, pelos macrófagos peritoneais de camundongos CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9% (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka, tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal)

| <i>Grupos</i> | <i>Produção Basal</i> | <i>Estimulada com LPS</i> | <i>Estimulada com LPS e INF-γ</i> | <i>Estimulada com INF-γ</i> |
|---------------|----------------------------------|---------------------------|---|---|
| Controle | 5,7 (4,9 - 9,6) | 8,7 (4,3 - 23,6) | 90,7 (12,9 - 493,6) ^{b,c} | 12,5 (4,7 - 63,8) |
| Tal | 5,4 (3,0 - 6,3) | 6,6 (4,5 - 22,7) | 7,0 (4,3 - 30,3) | 6,8 (4,9 - 155,2) |
| Pb | 6,2 (4,9 - 9,1) | 7,7 (5,7 - 11,7) | 7,22 (3,1 - 11,0) | 8,0 (6,0 - 17,4) |
| Pb+Tal | 7,6 (5,8 - 24,2) ^a | 8,3 (4,7 - 28,8) | 14,7 (4,9 - 58,9) | 13,4 (4,9 - 154,9) |

Anova ou Kruskal – Wallis para a comparação entre os grupos, e o teste Student Neuman-Keuls teste Dunn para as múltiplas comparações. ^a Diferença significativa (p = 0,034) na comparação entre o grupo Pb+Tal e o grupo Tal, ^{b,c} Diferença significativa (p = 0,001) na comparação do grupo Cont com o grupo Tal e Pb.

Tabela 4. Mediana (extremos) da produção de peróxido de hidrogênio basal ou estimulada com PMA 20 e 100 nM ou INF- γ , *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, não infectados tratados com NaCl 0,9 % ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* Anka, tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal)

| <i>Grupos</i> | <i>Produção Basal</i> | <i>Estimulada com PMA 20nM</i> | <i>Estimulada com PMA 100nM</i> | <i>Estimulada com INF -γ</i> |
|---------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|--|
| Controle | 5,8 (0,4 - 18,8) | 11,0 (5,4 – 76,3) | 7,5 (4,8 – 36,6) | 6,6 (0,4 – 14,0) |
| Tal | 6,4 (0,5- 20,9) | 5,6 (1,0 – 11,8) | 6,1 (0,4 – 11,2) | 5,9 (0,7 – 9,2) |
| Pb | 12,0 (2,2 – 50,0) | 14,7 (5,1 – 49,7) | 12,4 (3,8 - 73,5) | 6,7 (2,0 - 24,1) |
| Pb+Tal | 7,6 (1,2 -28,3) | 7,3 (1,4 – 28,9) | 8,0 (2,6 – 36,4) | 8,4 (1,3 - 26,3) |

Anova ou Kruskal – Wallis para a comparação entre os grupos, teste Student Neuman-Keuls teste Dunn para as múltiplas comparações.

Tabela 5. Mediana (extremos) da produção do peróxido de hidrogênio basal ou estimulada com PMA 20 e 100 nM ou INF- γ , in vitro, pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, não infectados tratados com NaCl 0,9 % (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* ANKA, tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb+Tal)

| <i>Grupos</i> | <i>Produção Basal</i> | <i>Estimulada com PMA 20nM</i> | <i>Estimulada com PMA 100nM</i> | <i>Estimulada com INF-γ</i> |
|---------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|
| Controle | 5,3 (0,5 - 7,5) | 4,0 (0,2 – 7,8) | 6,0 (3,4 – 11,3) | 6,3 (0,0 – 26,8) |
| Tal | 6,8 (4,5 - 40,2) | 7,1 (4,6 – 39,0) | 7,4 (3,2 – 41,0) | 6,6 (0,1 – 45,3) |
| Pb | 7,5 (4,2 – 11,1) ^{a,b} | 7,7 (4,0 – 10,3) ^c | 8,1 (4,3 - 11,1) | 8,2 (3,4 - 9,2) ^d |
| Pb+Tal | 5,4 (1,8 - 7,4) | 5,1 (0,0 – 9,2) | 5,5 (0,0 – 9,0) | 4,5 (0,0 - 8,9) |

Anova ou Kruskal – Wallis para a comparação entre os grupos, teste Student Neuman-Keuls e teste Dunn para as múltiplas comparações. ^a Diferença significativa (p = 0,004) na comparação do grupo Pb com o grupo Cont, ^b Diferença significativa (p = 0,02) na comparação do grupo Pb com o Pb+Tal, ^c Diferença significativa (p = 0,03) na comparação do grupo Pb com o Cont, ^d Diferença significativa (p = 0,04) na comparação entre o grupo Pb e o Pb+Tal.

Tabela 6. Mediana (extremos) da produção do peróxido de hidrogênio basal ou estimulada com PMA 20 e 100 nM ou INF- γ , in vitro, pelos macrófagos peritoneais de camundongos CBA, não infectados tratados com NaCl 0,9% (Cont) ou com Talidomida (Tal) e infectados com *P. berghei* ANKA, tratados com NaCl 0,9 % (Pb) ou com Talidomida (Pb Tal)

| <i>Grupos</i> | <i>Produção Basal</i> | <i>Estimulada com PMA 20nM</i> | <i>Estimulada com PMA 100nM</i> | <i>Estimulada com INF-γ</i> |
|---------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---|
| Controle | 7,6 (6,8 - 17,7) | 8,9 (7,3 - 23,1) | 16,2 (7,3 - 39,5) | 13,3 (7,0 - 29,3) |
| Tal | 6,2 (1,5 - 25,0) | 11,4 (3,9 - 45,2) | 8,4 (4,1 - 45,0) | 5,1 (0,0 - 8,7) |
| Pb | 11,8 (3,2 - 19,9) | 11,3 (3,0 - 19,1) | 12,2 (3,0 - 17,9) | 11,1 (8,8 - 22,4) ^c |
| Pb+Tal | 15,2 (10,8 - 25,8) ^a | 15,0 (9,0 - 24,8) | 15,9 (1,5 - 24,6) | 16,1 (9,1 - 24,8) ^b |

Anova ou Kruskal – Wallis para a comparação entre os grupos, teste Student Neuman-Keuls e teste Dunn para as múltiplas comparações. ^a Diferença significativa (p = 0,03) na comparação do grupo Pb+Tal com o grupo Tal, ^b Diferença significativa (p = 0,005) na comparação do grupo Pb+Tal com o grupo Tal, ^c Diferença significativa (p = 0,005) na comparação do grupo Pb com o grupo Tal