

**PAULO CESAR RODRIGUES TABANEZ**

**INFLUÊNCIA DA TALIDOMIDA SOBRE A INFECÇÃO  
MURINA POR *Plasmodium berghei* ANKA EM MODELOS  
SUSCEPTÍVEIS OU NÃO À MALÁRIA CEREBRAL**

**Dissertação de Mestrado**

**Brasília, DF  
2006**

**PAULO CESAR RODRIGUES TABANEZ**

**INFLUÊNCIA DA TALIDOMIDA SOBRE A INFECÇÃO  
MURINA POR *Plasmodium berghei* ANKA EM MODELOS  
SUSCEPTÍVEIS OU NÃO À MALÁRIA CEREBRAL**

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

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

**Brasília, DF  
2006**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular, área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília-DF, e foi realizado com recursos parcialmente providos do CNPq, processo número 74379/2003-5.4. Parte dos camundongos foi gentilmente cedido pela Fundação Oswaldo Cruz.

# DEDICATÓRIA

Dedico...

A L E G R I A I N C E N T I V O  
L R A Z A O F  
A I Z A D E H A R M O N I A  
U N Y B  
D E A P O I O  
D E U S A T E N Ç A O O  
M I N C E N T I V O  
C A P O I O S A B E D O R I A  
O T R C A R I N H O  
R A F E I N C E N T I V O  
A A T E N Ç A O A M I Z A D E  
G U I A S A B E D O R I A  
E I N C E N T I V O  
M A M O R O S A A P O I O  
C A R I N H O I N C E N T I V O  
A P O I O A M I Z A D E  
C O R A G E M L E A L D A D E  
S O L I D E Z E Z É P A R C E R I A  
F O R Ç A A L E G R I A  
S A B E D O R I A

... a essas pessoas pelos exemplos, ensinamentos e apoio dados até hoje.

# AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso criador supremo, aos meus guias espirituais, pois estou certo que estiveram e estarão sempre comigo, e especialmente aos meus pais, Iza e Ary, por todo alicerce de minha formação intelectual e emocional, pelo incentivo, apoio, amizade, pela compreensão, sabedoria e todos os infindáveis predicativos que lhes cabem, mas principalmente pelo exemplo de conduta ilibada que me dá força, coragem e obstinação nesta caminhada.

À querida Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, por ter proporcionado esta oportunidade, pela orientação, por compartilhar toda sua experiência profissional, seus ensinamentos, sabedoria, tolerância, paciência, compreensão, companheirismo, apoio e dedicação à pesquisa.

Ao Professor Dr. Carlos Eduardo Tosta, detentor de todo meu respeito e admiração, pela sua simplicidade, pela sua forma especial de “fazer ciência” que nos emociona, contagia e abre novos horizontes e perspectivas.

Aos pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz, Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima Ferreira da Cruz e Dr. Leonardo José de Moura Carvalho, por nos ceder a cepa do *Plasmodium berghei* ANKA e parte dos camundongos CBA utilizados neste trabalho.

À Professora Sr.<sup>a</sup> Selma Aparecida Souza Kückelhaus, pela amizade, incentivo, e presença em todos os experimentos, colaborando imensamente para a conclusão deste trabalho.

À Sr.<sup>a</sup> René de Oliveira Pires, que nos ensinou a rotina laboratorial e os primeiros passos junto ao início da pesquisa.

À Sr.<sup>a</sup> Shirley Claudino Pereira Couto, pelo auxílio na organização, na preparação e manutenção das substâncias e de todo material pertinente ao laboratório e ao Sr. José Siqueira da Silva pela confecção das lâminas usadas neste trabalho.

Ao Sr. Nelson Pelet Nascimento pelo preparo dos meios de cultura e pelo auxílio com a parasitemia.

Ao Srs. Silas Guerra Borges e Fabiano Queiroz, e a Sra. Iza Maria Rodrigues Tabanez, minha mãe, pela formatação, cálculos e correção.

Aos estagiários Rodrigo Henrique Pereira Porto dos Santos, Jofran da Cruz Barroso e Felipe Tironi pelo manejo dos animais no biotério e pelo auxílio durante

os procedimentos experimentais deste trabalho, e ao Mateus Pigossi Neves pelas fotos realizadas.

À Professora Sr.<sup>a</sup> Magda Verçosa e ao Professor Sr. Carlos Alberto Júnior por ter gentilmente cedido espaço no biotério do Laboratório de Ciências – Labocien do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, para a manutenção provisória dos animais.

Ao X Seminário Laveran & Deane sobre Malária (2005), organizado pela Fundação Oswaldo Cruz, pela oportunidade concedida para a apresentação deste projeto e pelas importantes sugestões que contribuíram para o amadurecimento científico deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos, pela ajuda, apoio, incentivo, compreensão em todas as horas e que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos camundongos, também criações divinas, utilizados como modelo experimental que nos permitiu conhecer um pouco mais sobre esta doença, mas que para isso, tiveram que ceder suas vidas em prol da pesquisa.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XIX
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Delineamento experimental.....	21
3.2 Tipo de estudo.....	23
3.3 Animais utilizados nos experimentos.....	23
3.4 Inóculo.....	24
3.5 Grupos de estudo.....	25
3.5.1 Grupos de estudo utilizados para análise das funções dos macrófagos.....	26
3.5.2 Grupos de estudo para avaliação da influência da talidomida sobre a mortalidade espontânea dos animais infectados com Plasmodium berghei ANKA de ambos os modelos experimentais.....	28
3.6 Peso.....	31
3.7 Hematócrito.....	31
3.8 Parasitemia.....	32
3.9 Obtenção dos macrófagos peritoneais.....	32
3.10 Determinação da capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais.....	33
3.11 Preparação de leveduras para o teste de fagocitose.....	34

3.12	Preparação do pool de soro fresco para avaliação da fagocitose facilitada por opsoninas.....	35
3.13	Produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais.....	35
3.14	Curva-padrão para a determinação do peróxido de hidrogênio.....	36
3.15	Padronização da dose ótima de acetato de forbol miristato (PMA) para determinar a produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos.....	37
3.16	Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais.....	38
3.17	Curva padrão para determinação da produção de óxido nítrico.....	39
3.18	Padronização da dose ótima de lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- $\gamma$ (INF- $\gamma$ ) para avaliar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos.....	40
3.19	Produção de fator de necrose tumoral (FNT) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais e mensuração no soro dos camundongos.....	41
3.20	Análise estatística.....	43
4	RESULTADOS.....	44
4.1	Curva de mortalidade.....	45
4.1.1	Influência da talidomida sobre a sobrevivência de camundongos Balb/C infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	45
4.1.2	Influência da sacarose sobre a sobrevivência de camundongos Balb/C infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	47
4.1.3	Influência da talidomida diluída em sacarose sobre a sobrevivência dos camundongos Balb/C infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	50
4.1.4	Influência da talidomida sobre a sobrevivência dos camundongos CBA infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	51
4.2	Evolução do peso dos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	53



4.2.1	Influência da talidomida na evolução do peso dos camundongos Balb/C.....	55
4.2.2	Influência da sacarose na evolução do peso dos camundongos Balb/C.....	57
4.2.3	Influência da talidomida diluída em sacarose na evolução do peso dos camundongos Balb/C.....	59
4.2.4	Influência da talidomida na evolução do peso dos camundongos CBA .....	60
4.2.5	Comparação da influência da talidomida na evolução do peso entre camundongos Balb/C e CBA.....	61
4.3	Evolução do hematócrito nos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	63
4.3.1	Influência da talidomida sobre a evolução do hematócrito em camundongos Balb/C.....	66
4.3.2	Influência da sacarose sobre a evolução do hematócrito em camundongos Balb/C.....	68
4.3.3	Influência da talidomida diluída em sacarose sobre a evolução do hematócrito em camundongos Balb/C.....	70
4.3.4	Influência da talidomida sobre a evolução do hematócrito em camundongos CBA.....	71
4.3.5	Comparação da evolução do hematócrito nos camundongos Balb/C e CBA.....	72
4.4	Evolução da parasitemia nos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	75
4.4.1	Influência da talidomida na evolução da parasitemia dos camundongos Balb/C.....	76
4.4.2	Influência da sacarose na evolução da parasitemia dos camundongos Balb/C.....	78
4.4.3	Influência da talidomida diluída em sacarose na evolução da parasitemia dos camundongos Balb/C.....	80
4.4.4	Influência da talidomida na evolução da parasitemia nos camundongos CBA.....	81

4.4.5	Comparação da influência da talidomida na evolução da parasitemia entre camundongos Balb/C e CBA.....	82
4.4.6	Aspectos morfológicos da parasitemia.....	84
4.5	Influência da talidomida sobre a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	85
4.5.1	Fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.....	86
4.5.2	Fagocitose pelos receptores para opsoninas.....	91
4.5.3	Aspectos morfológicos da fagocitose.....	96
4.6	Produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	97
4.6.1	Produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos Balb/C.....	98
4.6.2	Produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos CBA.....	100
4.6.3	Análise comparativa da produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos Balb/C e CBA.....	103
4.7	Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C e CBA na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	105
4.8	Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C e CBA na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	108
4.8.1	Produção de óxido nítrico pelos camundongos Balb/C.....	108
4.8.2	Produção de óxido nítrico pelos camundongos CBA.....	109
4.8.3	Análise comparativa da produção de óxido nítrico pelos camundongos Balb/C e CBA.....	110
5	DISCUSSÃO.....	113
6	CONCLUSÕES.....	132
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

8	ANEXO TABELAS.....	151
9	ANEXO REAGENTES.....	180

## LISTA DE ABREVIATURAS

[ ]	Concentração
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AMA-1	Antígeno da Membrana Apical 1
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
ARN	Ácido Ribonucléico
CD106	VCAM
CD31	PECAM
CD36	Glicoproteína de diferenciação leucocitária
CD40L	Ligante do CD40
CD54	ICAM-1
CD62E	Selectina endotelial
CD62P	Selectina plasmática
CN	Célula citotóxica natural
CPH1	Complexo Principal de Histocompatibilidade do tipo 1
CPH2	Complexo Principal de Histocompatibilidade do tipo 2
DNA	Ácido dextrorribonucléico
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERK	Cinase regulada por sinais extracelulares
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FNT	Fator de necrose tumoral
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GPI	Glicofosfatidilinositol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HOCL	Ácido hipocloroso
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1

<b>IF</b>	Índice fagocitário
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>JNK</b>	Cinase c-jun N terminal
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MAL</b>	Malária
<b>MC</b>	Malária cerebral
<b>MEK</b>	Cinase reguladora de mitógenos
<b>M</b>	Molar
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator de transcrição nuclear kappa B
<b>NHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub></b>	Dióxido de nitrogênio
<b>NOS I ou nNOS</b>	Enzima óxido nítrico sintase neuronal
<b>NOS II ou iNOS</b>	Enzima óxido nítrico sintase indutível
<b>NOS III ou eNOS</b>	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
<b>NOS</b>	Enzima óxido nítrico sintase
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Íon superóxido
<b>OH</b>	Radical hidroxila
<b>OH<sup>-</sup></b>	Íon hidroxila
<b>PAMPs</b>	Receptores para padrões de reconhecimento
<b>Pb</b>	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
<b>PECAM</b>	Molécula de adesão celular de plaquetas ao endotélio
<b><i>Pf</i> EMP1</b>	Proteína de ligação à membrana eritrocitária do <i>P. falciparum</i> - 1
<b>PIACM</b>	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária

<b>PMA</b>	Acetato forbol miristato
<b>R1FNT</b>	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
<b>R2FNT</b>	Receptor 2 do fator de necrose tumoral
<b>rPMP</b>	Receptor para padrão molecular de patógeno
<b>S</b>	Sacarose
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SH</b>	Sulfato de heparan
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>STF</b>	Solução salina tamponada com fosfato
<b>TA1</b>	Resposta celular do tipo 1
<b>TA2</b>	Resposta celular do tipo 2
<b>TAL</b>	Talidomida
<b>TCD4+</b>	Linfócito T CD4
<b>TCD8+</b>	Linfócito T CD8
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação de crescimento beta
<b>TOLL</b>	Receptor para padrões de reconhecimento TOLL
<b>VCAM</b>	Molécula de adesão celular vascular

**RESUMO**

A talidomida é uma droga imunomoduladora que tem sido utilizada experimentalmente em muitas condições clínicas, porém seu uso na malária ainda é insipiente. A malária é uma doença com alta morbi-mortalidade presente em todas as regiões tropicais do mundo. As manifestações severas da doença, possivelmente, estão ligadas à excessiva resposta imunitária, principalmente à produção de fator de necrose tumoral e radicais de oxigênio e nitrogênio. A talidomida diminui a produção de FNT por aumentar a degradação do seu ARNm e diminuir a ativação do NFκB. O presente trabalho avaliou a influência da talidomida sobre a evolução da malária e sobre as funções dos macrófagos em camundongos susceptíveis ou não à malária cerebral. Camundongos Balb/C e CBA foram infectados com  $10^6$  eritrócitos parasitados por *Plasmodium berghei* ANKA, tratados a partir do terceiro dia de infecção com 150 mg/Kg de talidomida diluída em solução a 0,8M de sacarose, por via oral, uma vez ao dia, em um volume de 100 μL. Outros dois grupos não foram infectados, mas foram tratados da mesma forma. No oitavo dia de infecção, o sangue foi obtido para a determinação do FNT e os macrófagos foram recuperados da cavidade abdominal para avaliação, *in vitro*, da capacidade fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e FNT. A capacidade fagocitária foi avaliada pelo teste de fagocitose, com ou sem opsoninas, em placa sendo determinado o índice fagocitário. A produção de peróxido de hidrogênio foi determinada pelo teste de oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. O óxido nítrico foi determinado pela reação de Griess. O FNT foi quantificado no soro e no sobrenadante das culturas dos macrófagos pelo teste imunoenzimático. A



influência da talidomida, mas também da sacarose e da associação da talidomida com sacarose foi avaliada na evolução da malária por meio da curva de sobrevivência, da parasitemia, anemia e peso dos camundongos Balb/C. Nos camundongos Balb/C, o tratamento com talidomida não modificou a sobrevivência, diminuiu a perda de peso, retardou a elevação da parasitemia em nove dias, porém agravou a anemia a partir do vigésimo primeiro dia de infecção. O tratamento com solução a 0,8M de sacarose antecipou em um dia o início da morte e diminuiu em nove dias o tempo de vida, aumentou a perda de peso no início da infecção e posteriormente, a partir do décimo quarto dia, reduziu a perda de peso, agravou a parasitemia e a anemia. Porém, a associação da talidomida com a sacarose não modificou a curva de sobrevivência e retardou a evolução da parasitemia a partir do vigésimo primeiro dia de infecção, por outro lado, agravou a evolução da anemia e aumentou a perda de peso a partir do vigésimo primeiro dia de infecção. Nos camundongos CBA, a associação da talidomida com sacarose não modificou a curva de sobrevivência dos animais, a perda de peso, a parasitemia e a anemia. Em relação à função dos macrófagos, o tratamento dos camundongos Balb/C e CBA com talidomida diluída em solução 0,8M de sacarose não alterou a capacidade fagocitária e a produção de peróxido de hidrogênio, modulou negativamente a produção de óxido nítrico e diminuiu a produção de FNT tanto na cultura de macrófagos quanto no soro. Nossos dados sugerem que a talidomida, nos camundongos Balb/C, modulou a hiperativação do sistema imunitário de forma benéfica, uma vez que os aspectos gerais da evolução da malária não foram alterados, ao contrário, houve diminuição da perda de peso e retardo na evolução da parasitemia, porém, a administração isolada de sacarose deve ser avaliada

pelos seus possíveis efeitos deletérios durante a infecção. Os dois modelos estudados não respondem da mesma forma à infecção provavelmente determinados por fatores genéticos. Sugerem, portanto, que a utilização da talidomida como terapia adjuvante aos anti-plasmodiais, antes das manifestações clínicas de gravidade, deve ser avaliada em seres humanos, exceto mulheres, com o objetivo de diminuir a grande morbidade e mortalidade da malária.

**ABSTRACT**

Thalidomide is an immunomodulatory drug that has been successfully evaluated in several clinical conditions, however it needs better evaluation in severe malaria. Malaria has high morbimortality in vast areas of the world. The excessive activation of the immune system, with increased production of tumor necrosis factor, oxygen and nitrogen reactive species, plays an important role in the pathogenesis of the disease. Thalidomide inhibits the production of TNF increasing the rate of mRNA degradation and depressing NFκB pathway. This work aimed to evaluate the influence of thalidomide on malaria outcome and on macrophage functions of susceptible (CBA) and not susceptible (Balb/C) mice to cerebral malaria. Balb/C and CBA mice were injected with  $10^6$  *Plasmodium berghei* ANKA infected-erythrocytes, and after three days mice were treated *per os* with 150 mg/Kg/day of thalidomide in 100 μL of 0,8M sucrose solution. The same treatment was administered to two other not infected groups. Another group was treated with only 0,8M sucrose solution. On the eightieth day after infection, blood was collected and macrophages were obtained from peritoneal cavity to assess, *in vitro*, immunological functions. Phagocytosis was evaluated by phagocytic index. Hydrogen peroxide was assessed by phenol red oxidation and nitric oxide production was assessed by Griess reaction. TNF production was evaluated in serum and supernatant of peritoneal macrophage cultures by immunoassay test. The influence of thalidomide on mortality, parasitemia, hematocrit and body weight was assessed in Balb/C and CBA-infected mice. Another Balb/c group treated with sucrose was added. Thalidomide did not influence the survival time, diminished body weight loss, delayed parasitemia in fortieth day, but worsened anemia twenty one days onward of infection in Balb/C mice compared to non-treated animals. The

treatment with sucrose prompts one day the beginning of death and nine days the survival time. Firstly sucrose increased and after fortieth day of infection decreased body weight loss. It worsened parasitemia and anemia compared to that non-treated animals. However, association of thalidomide and sucrose did not alter survival time and body weight loss but increased parasitemia on fourth day onward of infection and worsened anemia after twenty one days of infection compared to that non-treated animals. The association of thalidomide and sucrose to treat CBA infected mice did not alter the survival time, body weight loss, parasitemia or anemia. The treatment with thalidomide of Balb/C and CBA infected mice did not influence the phagocytosis and hydrogen peroxide production, but it downregulated nitric oxide production, and decreased TNF production in serum (Balb/C) and supernatant of peritoneal macrophage cultures (Balb/C and CBA). Our findings suggest that thalidomide improved the outcome of disease, by decreasing body weight loss and delaying the parasitemia. Treatment with sucrose should be better evaluated because its possible deleterious effects. Our findings suggest that both experimental models show different immunopathological mechanisms, probably due to genetic factors. Moreover, thalidomide as adjuvant therapy in human malaria should be evaluated, except in women, to reduce morbidity and mortality of severe malaria.

## **INTRODUÇÃO**

A malária é reconhecida como grave problema de saúde pública no mundo, estimando-se que em mais de 100 países, 50% da população esteja exposta ao risco de contrair a doença. A cada ano ocorrem cerca de 3 milhões de mortes e aproximadamente 5 bilhões de episódios clínicos de malária, sendo que mais de 90% destes casos ocorrem na África (Breman e cols, 2004).

No Brasil, a doença ainda apresenta elevado risco de transmissão na região amazônica, representada pelos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nos últimos anos, apesar da implantação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), na região amazônica (Silva-Junior, 2005) a doença ainda não se encontra sob controle. Tal cenário de elevada morbi-mortalidade caracteriza a malária como uma das mais importantes doenças parasitárias endêmicas no mundo (Breman e cols, 2004).

Várias são as razões para a alta incidência desta doença, e estas abrangem problemas políticos, econômicos, sociais, culturais, religiosos e biológicos (Miller e cols, 2002). As migrações de indivíduos não imunes para as áreas endêmicas, aspectos culturais, o tratamento inadequado da infecção, a dificuldade para o acesso ao tratamento, a resistência do parasita aos antimaláricos e do vetor aos inseticidas, a inexistência de vacina eficaz, entre outros fatores, fazem da malária uma doença de difícil controle (Sachs e Malaney, 2002; Miller e cols, 2002).

A malária é causada pelo protozoário intracelular *Plasmodium sp*, transmitido pela picada da fêmea do anofelino infectada, que inocula o esporozoíta no hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Existem 4 espécies de plasmódios que infectam os seres humanos: *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malarie* e

*P. falciparum* (Souza e Riley, 2002). Os parasitas possuem um ciclo de vida assexuado no hospedeiro vertebrado e sexuado no vetor. Após a inoculação, o esporozoíta migra pela corrente sanguínea e infecta o hepatócito. Após sua multiplicação, ao romper o hepatócito, invade o eritrócito, iniciando o ciclo intraeritrocitário. Nos eritrócitos, por esquizogonia, novos merozoítas são formados e liberados com a ruptura das hemácias, podendo infectar outras células (Meuwissen e Ponnudurai, 1988).

A imunidade antimalárica demora a ser adquirida e necessita contato contínuo para a sua manutenção (Walker e Brodie, 1982; Holder, 1999). O esporozoíta representa o primeiro estágio de encontro entre o hospedeiro e o parasita, enquanto que, no estágio eritrocitário, o ciclo de ruptura dos eritrócitos infectados produz a sintomatologia da malária. Fatores como a resposta imunitária individual, idade, número de infecções, infecções mistas, gestação, características genéticas do hospedeiro e da cepa de plasmódio, grau de transmissão local da malária, entre outros, são determinantes da imunidade e imunopatogenia (Miller e cols, 2002).

No fígado, antígenos do esporozoíta são processados e apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (CPH) de classe I, induzindo resposta citolítica pelos linfócitos T CD8+ e morte das células infectadas. O parasita, particularmente durante a ruptura do eritrócito na fase intraeritrocitária, estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, que desempenham importante papel tanto na imunidade quanto na imunopatogenia, ativando monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células citotóxicas naturais (natural killer) (CN) para reagirem aos estágios eritrocitário e hepático do parasita. Além disso, estimulam as células CN e T CD4+ a



produzirem interferon gama ( $\text{INF-}\gamma$ ), desencadeando uma cascata de respostas imunes que podem induzir à morte o parasita intracelular (Plebanski e Hill, 2000). A presença de anticorpos direcionados aos antígenos de superfície dos esporozoítas ou dos merozoítas pode impedir a entrada do parasita nos hepatócitos e nas hemácias, respectivamente, tanto por ocupar os sítios de ligação nas células do hospedeiro quanto por facilitar a fagocitose.

A fagocitose é potencializada pela ação dos anticorpos opsonizantes (Tosta e Wedderburn, 1980), que aumentam a aderência de eritrócitos parasitados aos macrófagos e a velocidade com que se processa a fagocitose (Tosta, 1982). Três células estão envolvidas neste importante processo de defesa do hospedeiro contra o plasmódio: os neutrófilos (Golenser e cols, 1992), os eosinófilos (Tosta e Wedderburn, 1980) e os fagócitos mononucleares (Tosta e cols, 1983). Porém, os monócitos e macrófagos têm sido considerados as células efetoras mais importantes na malária (Theander, 1991).

A destruição de eritrócitos contendo parasitas estimula fortemente o sistema de fagócitos. Macrófagos ativados por  $\text{INF-}\gamma$  participam do controle da infecção por mecanismos dependentes da fagocitose e independentes pela secreção de fatores solúveis direta ou indiretamente tóxicos ao parasita, tais como interleucina 1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral (FNT), fator de crescimento transformante beta ( $\text{TGF-}\beta$ ), fator estimulante de colônia granulócito-macrófago e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Clark e cols, 1997, Clark e Cowden, 2003). Tem sido sugerido que o  $\text{INF-}\gamma$  é essencial para a resolução da infecção primária, por limitar a fase inicial da replicação parasitária, mas também contribui para os sintomas agudos da infecção, como

febre, náuseas e dor de cabeça, por meio da indução de FNT e IL-1 (Rilley, 1999). A produção exacerbada de IFN- $\gamma$  e FNT predispõe à patologia grave (Plebanski e Hill, 2000).

O FNT é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica que apresenta um papel chave na patogenia das formas graves da malária. Ele é secretado principalmente por fagócitos mononucleares (Viajaykumar e cols, 2001) e neutrófilos (Chen e Sendo, 2001) em resposta a estímulos variados, como, por exemplo, a molécula glicofosfatidilinositol (GPI), presente nos plasmódios, que, ao se ligar aos receptores TOLL, ativa as vias de sinalização intracelular ERK, JNK e NF $\kappa$ B, estimulando a produção de mediadores pró-inflamatórios (Lamb e cols, 2006). Para que o FNT possa agir é preciso que se ligue a seus receptores (R1FNT e R2FNT) na superfície das células (Zhang, 2004).

O FNT pode induzir a sua própria produção e de outras citocinas, ativar linfócitos T e promover extravasamento de leucócitos para o sítio de infecção (Goetz e cols, 2004). Por outro lado, estimula a expressão de moléculas de aderência no endotélio vascular que pode aumentar o seqüestro de eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral (Gimenez e cols, 2003). Também estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos fagócitos, cujo papel não está totalmente elucidado, podendo tanto contribuir para a resposta imunitária quanto para a imunopatologia na malária (Clark e Cowden, 2003). Por outro lado, o FNT também age em linfócitos e monócitos, aumentando a inibição do *P. falciparum* por um mecanismo não relacionado à fagocitose, sugerindo um efeito antimalárico pleiotrópico (Muniz-Junqueira e Cols, 2001).

Os comprometimentos cerebral, renal e pulmonar, juntamente com a anemia, fazem parte das principais manifestações clínicas observadas na fisiopatogenia da malária grave, como consequência da resposta imunitária exacerbada ao estímulo antigênico causado pelo plasmódio (Newton e cols, 1998). A anemia é uma manifestação clínica freqüente da malária e a maior causa de morte entre crianças africanas, sendo que o envolvimento cerebral é a segunda causa e pode levar à mortalidade em 50% dos casos (Warrel, 1987).

A malária cerebral humana é uma condição neurológica séria que pode levar ao coma e à morte. Sua principal característica é o dano endotelial associado ao seqüestro de esquizontes de *P. falciparum* na microcirculação cerebral (Macpherson e cols, 1985). As células parasitadas expressam, em sua parede, antígenos variantes de superfície (EMP1), codificados pelos genes *var* do parasita, que são capazes de se ligar a vários receptores do hospedeiro. Tais receptores, como CD36, trombospondina, ICAM-1/CD54, PECAM/CD31, E-selectina/CD62E, P-selectina/CD62P, VCAM-1/CD106, sulfato de condroitina A e ácido hialurônico, estão presentes em vários órgãos (Turner e cols, 1994; Sherman e cols, 2003; Cooke e cols, 2005; Schofield e Grau, 2005).

A expressão aumentada de moléculas de adesão endotelial causada pelo FNT tem sido sugerida como fator determinante da patogenia (Hviid e cols, 1993; Newbold e cols, 1997), aumentando o seqüestro de células na microcirculação do cérebro e de outros órgãos do corpo, como coração, pulmão, fígado, rins, tecido subcutâneo e placenta (Grau e cols, 1987; Grau e cols, 1993). Além disto, sugere-se que a formação de rosetas, entre eritrócitos parasitados e não-parasitados, e a citoaderência destas rosetas ao endotélio pelo receptor CD36 ou CD31 (Fernandez e cols, 1998) podem contribuir para a

malária cerebral humana, por diminuir o fluxo sangüíneo e facilitar o acúmulo de leucócitos (Bate e cols, 1988). Estes leucócitos, ativados pela multiplicação dos parasitas seqüestrados, produzem localmente citocinas inflamatórias, principalmente FNT, e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, que ativam as células endoteliais, levando ao dano tecidual (Schofield e Grau, 2005) e à ruptura da barreira hemato-encefálica (Penet e cols, 2005).

A malária grave afeta vários tecidos e órgãos, mesmo quando as manifestações mais marcantes aparentam envolver apenas um único órgão, como o cérebro. Em particular, a acidose metabólica tem sido reconhecida como uma importante característica fisiopatológica na síndrome clínica clássica da malária cerebral e da anemia grave (Marsh e cols, 1995), sendo que na maioria dos casos, isto se deve predominantemente à acidose láctica. Entretanto, provavelmente, é a combinação de diversos fatores que reduzem a oxigenação e a perfusão tecidual (English e cols, 1997).

A anemia grave pode ser determinada por diversos mecanismos pouco elucidados, incluindo ruptura dos eritrócitos pós-esquizogonia, fagocitose, com ou sem auxílio de anticorpos e complemento, alterações de membrana e redução na deformabilidade dos eritrócitos infectados e não infectados, diseritropoiese, seqüestro de sangue no baço e coagulopatia (Dondorp e cols, 2000).

Entretanto, estudos com malária grave, principalmente a forma cerebral em humanos, são difíceis, tendo em vista a impossibilidade de se correlacionar precisamente as alterações patológicas com a evolução clínica da doença. Modelos murinos geneticamente resistentes e susceptíveis à malária cerebral têm sido muito estudados devido às semelhanças existentes entre as respostas

imunitárias ao parasita em roedores e humanos (Lou e cols, 2001; Hunt e Grau, 2003). Por outro lado, tem-se demonstrado que existem diferenças, principalmente o seqüestro preferencial de leucócitos na circulação cerebral em camundongos (Grau e cols, 1990), enquanto que os eritrócitos é que são seqüestrados em seres humanos (Aikawa e cols, 1990).

As alterações patológicas dependem da combinação entre a cepa de camundongo e o plasmódio utilizado. Das quatro espécies de parasitas murinos (*P. chabaudi*, *P. berghei*, *P. vinckei* e *P. yoelli*) utilizadas como modelo experimental para o estudo da malária humana, o *P. berghei* ANKA parece ser o modelo para estudo da malária cerebral quando infecta camundongos CBA (Combes e cols, 2005). Estes camundongos desenvolvem sinais neurológicos, assim como nos seres humanos, e morrem entre o sétimo e o décimo primeiro dia de infecção com baixa parasitemia. Por outro lado, os camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA não apresentam comprometimento cerebral e morrem por anemia grave e hiperparasitemia na terceira semana de infecção (Grau e cols, 1987). O fenótipo dos modelos experimentais susceptíveis e resistentes à malária cerebral se baseia, fundamentalmente, em diferenças geneticamente predeterminadas quanto à sensibilidade das células endoteliais da microcirculação à ativação pelo FNT e a progressão da doença (Combes e cols, 2005).

Entre os mecanismos envolvidos na fisiopatogenia da malária cerebral, o óxido nítrico (ON) tem sido apontado como uma molécula crucial (Clark e Cowden, 2003), embora seu mecanismo de ação ainda seja controverso. O ON é uma molécula produzida durante a conversão enzimática da L-arginina em L-citrulina, na presença de NADPH, pela enzima constitutiva sintase do óxido

nítrico neuronal (nNOS ou NOS1), endotelial (NOSe ou NOS3) ou induzida (iNOS ou NOS2). Tais sistemas enzimáticos podem depender de cálcio (nNOS e eNOS) ou ser induzidos por citocinas (iNOS) (Sobolewski e cols, 2005).

No sistema imunitário, o ON derivado da iNOS é um componente da resposta imune inata e é requerido para o controle de diversas infecções virais, bacterianas e parasitárias (Bogdan, 2000). Na malária, o ON produzido pode ser tanto benéfico, levando à morte do plasmódio (Stevenson e cols, 2004), quanto deletério, pelos efeitos adversos que medeiam a patogênese por meio do estresse oxidativo, sinalização aberrante no cérebro (Clark e Cowden, 2003) e a anemia (Anstey e cols, 1999).

A hipoargininemia (Lopansri, e cols, 2003) e baixos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (Anstey e cols, 1996), produtos estáveis de degradação do ON, têm sido correlacionados com o desenvolvimento da malária grave por *P. falciparum*, sugerindo baixos níveis de ON durante a infecção. Corroborando tal informação, níveis elevados de hemoglobina livre e de superóxido no sangue de pacientes com malária grave são responsáveis pela rápida remoção do ON produzido pelas células endoteliais dos vasos (Ekvall e cols, 2001). Entretanto, resultados opostos, como níveis aumentados de nitrato e nitrito no líquido cérebro-espinhal (Weiss e cols, 1998) e de iNOS em cérebros de pacientes com malária cerebral (Clark e Cowden, 2003), têm sido correlacionados com a gravidade da doença por *P. falciparum*.

Em modelos experimentais, tem sido sugerido que o ON não parece mediar a patogênese na malária ou ter um efeito antiparasitário, uma vez que camundongos infectados por *P. berghei* ANKA e deficientes da NOS ou tratados com aminoguanidina, um inibidor da NOS, não desenvolveram malária

cerebral, apresentando parasitemia, patogênese e mortalidade similares quando comparados ao controle (Favre e cols, 1999). Porém, em camundongos infectados pelo *P. chabaudi*, o aumento da produção de ON durante o estágio intraeritrocitário da infecção foi relacionado à proteção contra a doença (Taylor-Robinson e Smith, 1999), mostrando que ainda é controversa a ação do ON na malária.

Espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas a partir da redução do oxigênio molecular, também têm sido apontadas como moléculas importantes na fisiopatogenia da malária cerebral (Rangan e Bulkley, 1993). Entre elas se encontram o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ). Normalmente, o organismo é capaz de se proteger das EROs através de redução enzimática, antioxidantes (endógenos e exógenos) e quelantes de metais. Quando os níveis de EROs excedem os mecanismos de proteção, a célula entra em estresse oxidativo e, sob esta condição, tais radicais altamente tóxicos podem causar lesão química no ácido desoxirribonucléico (ADN), proteínas e lipídios insaturados (Klebanoff, 1992).

A NADPH oxidase, associada à membrana, transfere um elétron para o oxigênio molecular, resultando em um radical superóxido ( $O_2^-$ ), o qual é rapidamente reduzido, de forma espontânea ou pela enzima superóxido dismutase (SOD), a peróxido de hidrogênio. A proteção contra os efeitos deletérios do  $H_2O_2$  se dá pela sua degradação em água e oxigênio, pela catalase ou por algumas peroxidases, como a glutathiona peroxidase. Durante a explosão respiratória, o peróxido de hidrogênio reage com os íons cloreto através do sistema de mieloperoxidase existente nos fagócitos, originando ácido hipocloroso (HOCL), responsável pela atividade microbicida (Thomas,

1979; Babior, 1999). O radical superóxido ainda pode interagir com  $H_2O_2$  na presença de íons  $Fe^{3+}$  (Weiss, 1977) ou mediar a redução do ácido hipocloroso (HOCL) (Candeias e cols, 1993), levando à formação do radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ).

Os fagócitos possuem uma maquinaria complexa que produz e secreta ativamente grandes quantidades de EROs (Babior, 1999), quando estimulados por produtos microbianos, como LPS, lipoproteínas e citocinas, como  $INF-\gamma$ , IL-8, FNT, como também pela ligação da IgG aos seus receptores Fc (Bogdan e cols, 2000).

O papel microbicida dos radicais de oxigênio foi demonstrado para *Plasmodium falciparum* (Malhotra e cols, 1988), *P. berghei* (Dochrell e Playfar, 1983), *P. yoelii* (Ockenhouse e Shear, 1984), *P. chabaudi* (Stenvenson e cols, 1995) e *P. vinckei* (Clark e Hunt, 1983), tanto *in vitro* (Ockenhouse e Shear, 1984) quanto *in vivo* (Dochrell e Playfar, 1983; Ockenhouse e Shear, 1984; Stenvenson e cols, 1995). O  $H_2O_2$ , *in vivo*, foi parasiticida contra *P. yoelii* e *P. chabaudi*, quando os camundongos foram tratados com 1 mg endovenoso no quinto e no sexto dia de infecção, resultando em significativa redução da parasitemia (Dochrell e Playfar, 1983). Foi observado em um estudo clínico e parasitológico de 75 crianças do Gabão com malária por *P. falciparum*, relação significativa entre a capacidade dos granulócitos produzirem grandes quantidades de radicais de oxigênio e o controle da parasitemia, demonstrando que EROs têm função básica nas respostas imunitárias como primeira linha de defesa contra esta espécie (Greve e cols, 1999). Por outro lado, Kremsmer e cols (2000) correlacionaram o aumento da produção de EROs com a gravidade da doença em crianças do Gabão.



Pelo fato de a malária ser uma doença cuja sintomatologia é determinada pela exacerbação da resposta imunitária, onde o FNT tem importância crucial na determinação das formas graves da doença, o estudo da função de drogas imunomoduladoras – entre elas a talidomida, que inibe seletivamente o FNT, coestimula linfócitos T e modula a expressão de moléculas de aderência em células endoteliais – é importante, com vistas à sua indicação como tratamento adjuvante aos antiparasitários na malária humana.

A talidomida,  $\alpha$ -ftalimidoglutaramida, foi fortemente estigmatizada pelos seus efeitos teratogênicos, que abalaram o mundo na década de 60, após o nascimento de cerca de 10.000 crianças com mal-formações induzidas após seu uso pelas mães grávidas. A droga ressurgiu em 1965 como uma alternativa para o tratamento das lesões do eritema nodoso da hanseníase, uma vasculite caracterizada por nódulos subcutâneos dolorosos, febre, entre outros sintomas, e, em 1998, o FDA aprovou sua indicação para esta situação clínica (Sampaio e cols, 1993; Sampaio e cols, 2002). Desde então, suas propriedades terapêuticas têm sido vastamente pesquisadas e utilizadas experimentalmente, principalmente como terapia adjuvante, em mais de 150 condições clínicas oncológicas, dermatológicas e antiinflamatórias (Raje e Anderson, 2002; Franks e cols, 2004).

A talidomida tem sido estudada em várias outras condições, como na doença do enxerto versus hospedeiro, lúpus eritematoso discóide, sarcoidose, macroglobulinemia de Waldenström (Matthews e McCoy, 2003), mieloma múltiplo refratário, síndrome mielodisplásica, leucemia mieloide aguda, carcinoma de células renais, gliomas malignos, câncer de próstata, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorretal, doença de Behçet, doença de Crohn (Marriot e

cols, 1999; Raje e Anderson, 1999; Singhal e cols, 1999, Richardson e cols, 2002; Matthews e Maccoy, 2003; Franks e cols, 2004), aftas ulceradas orais e perda de peso associadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (Jacobson e cols, 1997), insuficiência cardíaca congestiva (Davey e Ashrafian, 2000) e no choque séptico (Arrieta e cols, 1999). Os efeitos adversos mais freqüentes incluem sonolência, constipação, neuropatia e tromboembolismo (Ghobrial e Rajkumar, 2003).

A molécula da talidomida é um análogo racêmico do ácido glutâmico, que consiste em enantiômeros L(-) e D(+), que se interconvertem sob condições fisiológicas. A forma L(-) potencialmente inibe a liberação de FNT de monócitos e macrófagos, enquanto que a forma D(+) parece exercer um efeito sedativo (Wnendt e cols, 1996).

Os mecanismos responsáveis pela ação imunomoduladora, antiinflamatória e antiangiogênica da talidomida ainda não estão totalmente esclarecidos, embora a modulação de citocinas inflamatórias, como FNT, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-12, cicloxigenase 2 (COX-2), bem como o fator nuclear de transcrição  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B), estejam envolvidos (Franks e cols, 2004). Os efeitos antiinflamatórios e antiangiogênicos da talidomida são controlados, em parte, por meio do NF $\kappa$ B. Uma vez que a célula é estimulada, as porções citoplasmáticas dos seus receptores recrutam e ativam moléculas intracelulares, como as cinases das cinases inibitórias (IKKs) que fosforilam o inibidor do NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ). Portanto, o NF $\kappa$ B, que estava inativo, torna-se livre para ser translocado para o núcleo, onde será responsável pela ativação gênica de uma série de moléculas envolvidas no crescimento celular,

supressão da apoptose, respostas inflamatórias e imunitárias, inclusive pela produção de FNT (Li e Stark, 2002; Bottex-Gauthier e cols, 2002).

A talidomida inibe a produção de FNT em monócitos humanos e macrófagos de camundongos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS), por aumentar a degradação do ácido ribonucléico mensageiro (ARNm) desta citocina (Sampaio e cols, 1991; Moreira e cols, 1993). É possível que a talidomida também iniba a produção de FNT de forma indireta, inibindo as IKKs e, portanto, a ativação do NFκB (Keifer e cols, 2001).

A talidomida também pode agir como sinal coestimulatório para ativação das células T, *in vitro*, resultando em aumento da produção de IL-2 e INF-γ, sendo que este efeito é mais intenso nas sub-populações de linfócitos T CD8+ do que nas T CD4+ (Haslett e cols, 1998). Estudos demonstram que a talidomida modifica a polarização da resposta de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (TA1) para respostas do tipo 2 (TA2) (Mchugh e cols, 1995; Verbon e cols, 2000); porém, existem controvérsias sobre esta função, provavelmente devido aos diferentes modelos celulares estudados e ao tipo de ativação imunitária (Teo e cols, 2005).

Observou-se também um efeito bidirecional quanto à produção de IL-12. Tal citocina pode ter sua produção inibida em macrófagos estimulados com LPS, entretanto, aumentada quando estas células são co-cultivadas com linfócitos T na presença da talidomida. Este efeito se deve ao aumento da expressão de receptores CD40L e de uma ação coestimulatória na ausência do segundo sinal para os linfócitos T, sem que induza anergia ou apoptose (Corral e Kaplan, 1999).

Ademais, a talidomida pode reduzir a produção de IL-6 (Rowland e cols, 1998), aumentar a produção de IL-2 (Shannon e cols, 1997), IL-4, IL-5 (Mchugh e cols, 1995), *in vitro*, bem como a sub-população de linfócitos T CD8+ e diminuir as células citotóxicas naturais em camundongos (Karrow e cols, 2000). A talidomida também inibe a expressão da enzima COX-2, mas não da COX-1, em monócitos estimulados com LPS, FNT e IL-1 $\beta$ , por diminuir a meia-vida do ARNm da COX-2. Tal estudo sugere que, em parte, a inibição da expressão da COX-2 deva ser pelo aumento da produção de IL-10 (Payvandi e cols, 2004).

Estudos utilizando microscopia intravital determinaram que a talidomida diminuiu o número de leucócitos em rolamento, aderindo e migrando através das vênulas, após estímulo com LPS (Schneider e cols, 1997), além de modular a expressão de moléculas de aderência, como a L-selectina, na superfície de leucócitos (Zwingenberger e Wnendt, 1996).

As pesquisas sobre a influência da talidomida na malária ainda são elementares. Ramirez-Villafuerte e cols (1998) relataram o uso da talidomida em camundongos CB6F1 infectados por *P. chabaudi chabaudi* e tratados com 3 mg da droga, 3 vezes por semana. Estes autores observaram que a hipoglicemia foi menos severa, porém nenhum efeito sobre a parasitemia, anemia ou produção de anticorpos foi detectado. Em outra pesquisa, o modelo utilizado foi o camundongo susceptível à malária cerebral, CBA, infectado por *P. berghei* ANKA. Os animais foram tratados desde o segundo dia da infecção para se minimizar a interferência do tratamento no efeito antiparasitário do FNT. Demonstrou-se que a talidomida retardou o início da morte e aumentou em dois dias a sobrevivência espontânea dos animais. Além disso, a talidomida aumentou a capacidade fagocitária, a produção de peróxido de hidrogênio e

óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais, embora nenhum efeito tenha sido detectado na parasitemia, atribuindo efeito protetor à imunomodulação causada pela talidomida para este modelo experimental (Muniz-Junqueira e cols, 2005).

Os efeitos da talidomida, como a modulação da produção de FNT, da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, coestimulação sobre a imunidade celular e sua influência sobre múltiplas células do organismo, sugerem um papel imunomodulador na infecção malárica, particularmente nas formas graves da doença decorrentes do desequilíbrio da resposta imunitária, diminuindo os fatores relacionados à patogênese e melhorando a defesa antiparasitária. Seu uso já foi avaliado, experimentalmente, no modelo de camundongos susceptíveis à malária cerebral, porém, apenas uma minoria dos indivíduos infectados evolui, imprevisivelmente, para esta forma grave da doença. Como não se sabe quem apresentará a forma cerebral da malária, torna-se importante avaliar a influência da talidomida no modelo não susceptível à malária cerebral, uma vez que o tratamento, como adjuvante aos anti-plasmodiais, para ser eficaz, deve ser instituído precocemente, antes do aparecimento dos sinais neurológicos, e provavelmente, em indivíduos que não apresentariam a forma cerebral da doença.

## **OBJETIVOS**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da talidomida em camundongos Balb/c, modelo não susceptível à malária cerebral, infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, sobre a evolução da doença pela avaliação da curva de mortalidade espontânea, parasitemia, hematócrito e peso, e sobre as funções dos fagócitos avaliadas pela capacidade fagocitária, produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral.

Os objetivos foram desenvolvidos por meio da:

1) Avaliação da influência da talidomida sobre a sobrevivência de camundongos resistentes (Balb/c) e susceptíveis (CBA) à malária cerebral infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA;

2) Avaliação da influência da talidomida sobre a parasitemia de camundongos resistentes e susceptíveis à malária cerebral infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA;

3) Avaliação da influência da talidomida sobre o hematócrito de camundongos resistentes e susceptíveis à malária cerebral infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA;

4) Avaliação da influência da talidomida sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais, *in vitro*, na ausência ou na presença de opsoninas, de camundongos resistentes e susceptíveis à malária cerebral infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA;

5) Avaliação da influência da talidomida sobre a produção, *in vitro*, de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos resistentes e susceptíveis à malária cerebral infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA;

6) Avaliação da influência da talidomida sobre a produção, *in vitro*, de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos resistentes e susceptíveis à malária cerebral infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA;

7) Avaliação da influência da talidomida sobre a produção, *in vitro*, de fator de necrose tumoral por macrófagos peritoneais de camundongos resistentes e susceptíveis à malária cerebral infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA;

8) Avaliação da influência da talidomida sobre a produção, *in vivo*, de fator de necrose tumoral de camundongos resistentes e susceptíveis à malária cerebral infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA;



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

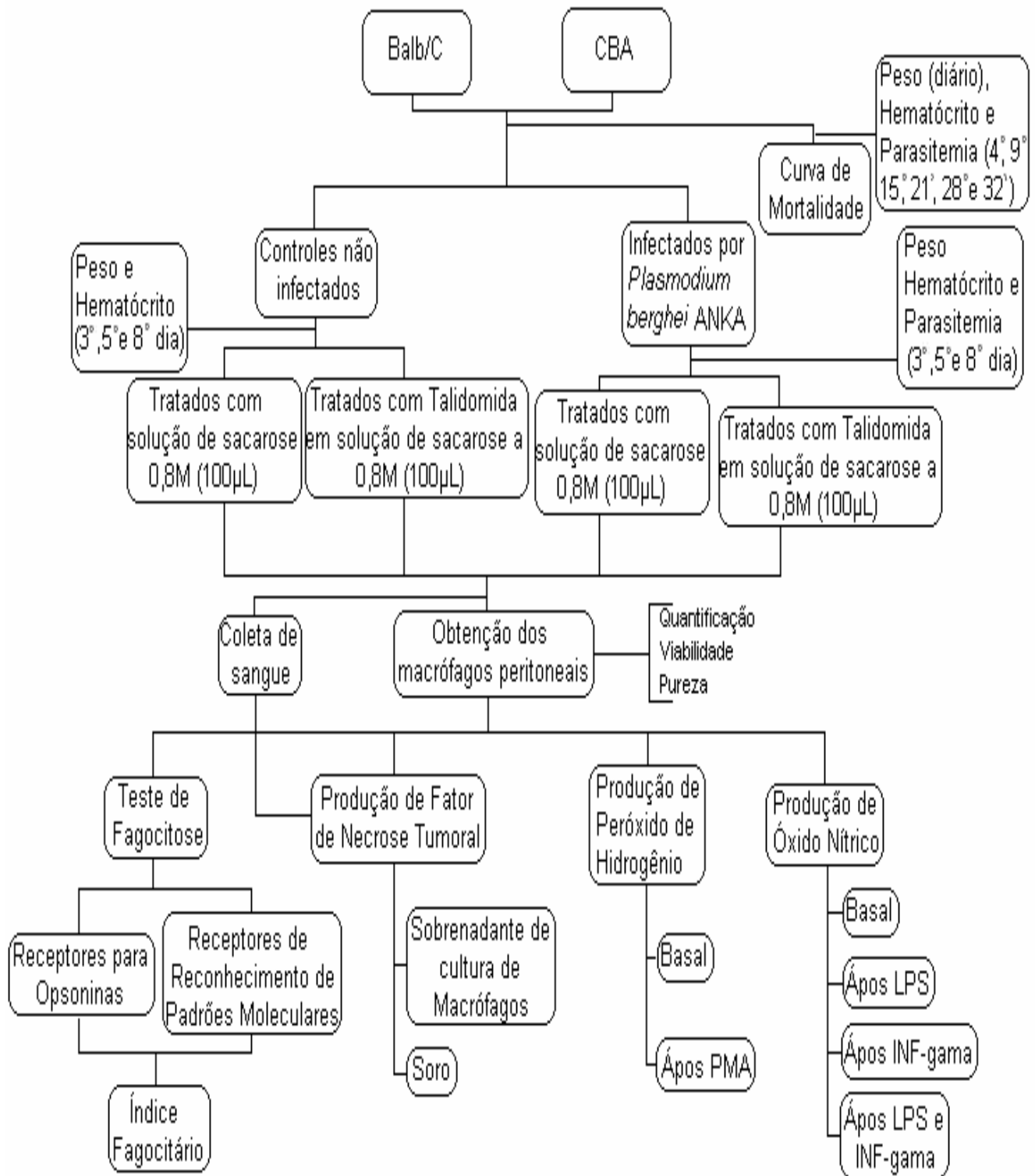
### 3.1. Delineamento experimental

Camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, e camundongos CBA, susceptíveis à malária cerebral, foram divididos em grupos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. Os grupos foram tratados com talidomida diluída em solução de 0,8M de sacarose ou apenas com solução de 0,8M de sacarose, em 100 µL, do terceiro ao oitavo dia de experimento. No oitavo dia, os animais foram sacrificados e os macrófagos peritoneais coletados para avaliação funcional. Os macrófagos foram testados para capacidade fagocitária, produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral. O fator de necrose tumoral foi avaliado tanto no sobrenadante das culturas de macrófagos quanto no soro dos camundongos, também coletado durante o sacrifício.

Paralelamente, para o estudo da mortalidade espontânea, camundongos Balb/C foram infectados e tratados com talidomida, talidomida diluída em solução de 0,8M de sacarose, apenas com solução de 0,8M de sacarose ou água destilada, no volume de 100 µL. Os camundongos CBA foram infectados e tratados com talidomida diluída em solução de 0,8M de sacarose ou apenas com solução de 0,8M de sacarose, em 100 µL.

O hematócrito, a parasitemia e o peso foram avaliados tanto no grupo utilizado para estudo da função de macrófagos quanto na mortalidade espontânea.

O estudo seguiu o delineamento geral conforme discriminado na **figura 1**.



**Figura 1** – Delineamento experimental

### **3.2. Tipo de estudo**

Este estudo é do tipo experimental e foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular, da área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, utilizando o camundongo Balb/C como modelo experimental não susceptível à malária cerebral e o camundongo CBA como modelo experimental susceptível à malária cerebral, ambos infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA.

Durante toda a realização deste trabalho, as normas éticas para a pesquisa científica com animais de laboratório foram rigorosamente obedecidas, conforme determinação da Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979, e dos Princípios Éticos para Experimentação com Animais de Laboratório, definidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1990). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Brasília.

### **3.3. Animais utilizados nos experimentos**

Os animais de ambas as cepas acima descritas eram machos, com idade entre 8 e 12 semanas, tendo sido uma parte comprada do Centro de Bioterismo de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, e outra parte gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em grupos de no máximo cinco animais, com água e ração *ad libitum*, sob condições de luz controlada com ciclos de 12 horas, submetidos à temperatura ambiente. Antes

da realização dos experimentos, a ambientação dos camundongos Balb/C foi feita, durante 30 dias, no biotério da Faculdade de Saúde do Centro Universitário de Brasília – Uniceub, e do CBA, durante 30 dias no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

### **3.4. Inóculo**

A cepa do *Plasmodium berghei* ANKA foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Imunologia da Malária – Fiocruz – Rio de Janeiro – RJ e mantida em nitrogênio líquido, em solução preservadora de Alsevier. Antes de infectar os animais dos grupos de estudo, a cepa era descongelada e faziam-se duas passagens em camundongo Swiss, inoculando-os com  $10^6$  eritrócitos parasitados, suspensos em solução salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2, estéril, por via intraperitoneal (IP) (Clark e cols, 1990; Kremsner e cols, 1991; Neill e Hunt, 1992).

A coleta do sangue para a passagem do inóculo de um camundongo Swiss para outro era realizada por punção cardíaca, quando a parasitemia encontrava-se acima de 10%. Para que os animais do grupo de estudo fossem inoculados com  $10^6$  eritrócitos parasitados, o número de eritrócitos totais na suspensão era quantificado em câmara de Neubauer e a determinação da parasitemia era feita pela contagem de 500 eritrócitos em um distendido delgado, fixado com metanol e corado com Giemsa a 10%, por 10 minutos.

### 3.5. Grupos de estudo

O estudo foi dividido em duas etapas: a análise das funções dos macrófagos peritoneais – como a fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e fator de necrose tumoral, tanto do soro quanto do sobrenadante das culturas de macrófagos – e a curva de mortalidade espontânea. Utilizaram-se camundongos Balb/C e CBA divididos em grupos de animais não infectados e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

Para o estudo da função dos macrófagos, os animais não infectados, de ambas as cepas, foram tratados com talidomida diluída em solução de 0,8M de sacarose ou apenas com solução de 0,8M de sacarose, em 100 µL, uma vez ao dia, via oral, até o oitavo dia. A administração oral foi realizada por meio de micropipeta de 200 µL calibrada para o volume administrado. Os animais infectados foram tratados seguindo o mesmo protocolo. Portanto, cada animal, independente do tratamento, recebia 20 mg de sacarose por dia. No oitavo dia, os macrófagos peritoneais foram recuperados e avaliados quanto a sua função fagocitária, produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral. Além disso, o fator de necrose tumoral também foi avaliado no sangue. A pesagem, a parasitemia e o hematócrito foram realizados nos terceiro, quinto e oitavo dias da infecção.

A curva de mortalidade espontânea foi realizada seguindo-se as mesmas doses e intervalos do tratamento acima descritos. Para os camundongos Balb/C, a curva foi delineada tratando-os com talidomida, talidomida diluída em solução de 0,8M de sacarose, apenas com solução de 0,8M de sacarose ou água destilada, em 100 µL. Para os camundongos CBA, a

curva foi realizada tratando-os com talidomida diluída em solução de 0,8M de sacarose ou apenas com solução de 0,8M de sacarose, em 100 µL.

O peso foi avaliado diariamente.

O hematócrito e a parasitemia foram realizados, no grupo Balb/C, nos quarto, nono, décimo quinto, vigésimo primeiro, vigésimo oitavo e trigésimo segundo dias de infecção e, no grupo CBA, nos quarto, nono, décimo quinto e vigésimo primeiro dias de infecção.

### **3.5.1. Grupos de estudo utilizados para análise das funções dos macrófagos**

Os camundongos Balb/C e CBA foram divididos, para avaliação da função dos macrófagos, nos seguintes subgrupos:

**Grupo Pb+Tal:** no qual 13 camundongos Balb/C e 5 CBA foram infectados por via intraperitoneal (IP) com  $10^6$  eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA suspensos em 100 µl de STF, pH 7,2, e tratados com 150 mg/kg/dia de talidomida (Fundação Ezequiel Dias – FUNED/BH) diluída em 100 µL de solução 0,8M de sacarose (Hauschild e cols, 1997; Karrow e cols, 2000), por via oral, a cada 24 horas, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção. A média  $\pm$  DP do peso dos camundongos Balb/C foi de 31,8g  $\pm$  3,2g e dos CBA foi de 24,0g  $\pm$  3,6g.

**Grupo Pb:** no qual 13 camundongos Balb/C e 4 CBA foram infectados por via IP com  $10^6$  eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA,

suspensos em 100 µl de STF, pH 7,2, e tratados com 100 µl de solução de sacarose 0,8M, via oral, a cada 24 horas, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção. A média ± DP do peso dos camundongos Balb/C foi de 32,4g ± 3,4g e dos CBA foi de 20,0g ± 6,0g.

**Grupo Tal:** no qual 13 camundongos Balb/C e 3 CBA não infectados receberam, por via IP, 100 µl de STF, pH 7,2, no primeiro dia e foram tratados com 150 mg/kg/dia de talidomida (Fundação Ezequiel Dias – FUNED/BH) diluída em 100 µL de solução de sacarose 0,8M, por via oral, a cada 24 horas, a partir do terceiro até o oitavo dia do experimento. A média ± DP do peso dos camundongos Balb/C foi de 30,1g ± 3,1g e dos CBA foi de 19,0g ± 4,0g.

**Grupo Controle Normal:** no qual 13 camundongos Balb/C e 3 CBA não infectados receberam 100 µl de STF, pH 7,2, por via IP, no primeiro dia do experimento e foram tratados com 100 µl de solução de sacarose 0,8M, via oral, a cada 24 horas, a partir do terceiro até o oitavo dia do experimento. A média ± DP do peso dos camundongos Balb/C foi de 31,9g ± 3,0g e dos CBA foi de 21,0g ± 5,1g.

Não houve diferença estatística no dia da inoculação entre as médias dos pesos dos animais dos diferentes grupos de camundongos Balb/C,  $p=0,716$ , pelo teste ANOVA, nem entre as médias dos pesos dos diferentes grupos de camundongos CBA,  $p=0,487$ , pelo teste de Kruskal-Wallis. Porém, pelo teste Mann-Whitney, o peso dos animais CBA foi significativamente menor do que dos animais do grupo Balb/C neste mesmo dia,  $p<0001$ .



Os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por deslocamento cervical no oitavo dia do experimento. Imediatamente após o sacrifício, foram coletados os macrófagos peritoneais para os testes funcionais. O sangue para obtenção de soro também foi coletado no oitavo dia de infecção por avulsão do plexo ocular. O hematócrito, a parasitemia e o peso foram avaliados nos terceiro, quinto e oitavo dias de infecção.

### **3.5.2. Grupos de estudo para avaliação da influência da talidomida sobre a mortalidade espontânea dos animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA de ambos os modelos experimentais**

Para avaliar a influência do tratamento com a talidomida e da associação da talidomida com sacarose sobre a sobrevivência dos camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, 39 camundongos Balb/C e 16 camundongos CBA foram infectados com  $10^6$  eritrócitos parasitados pelo *P. berghei* ANKA (Clark e cols, 1990). O tratamento foi realizado por via oral, em um volume de 100 µl, diluído em água destilada, a cada 24 horas, a partir do terceiro dia de infecção.

A divisão dos grupos de camundongos Balb/C foi realizada da seguinte forma:

**Grupo Pb+T+S:** no qual 9 camundongos Balb/C foram tratados com 150 mg/kg/dia de talidomida (Fundação Ezequiel Dias – FUNED/BH) diluída em 100

$\mu\text{L}$  de solução de sacarose 0,8M. A média  $\pm$  DP do peso deste grupo foi de  $27,7\text{g} \pm 1,7\text{g}$ .

**Grupo Pb+T:** no qual 10 camundongos Balb/C foram tratados com 150 mg/kg/dia de talidomida (Fundação Ezequiel Dias – FUNED/BH). A média  $\pm$  DP do peso deste grupo foi de  $25,4\text{g} \pm 3,10\text{g}$ .

**Grupo Pb+S:** no qual 10 camundongos Balb/C foram tratados com 100  $\mu\text{L}$  de solução de sacarose 0,8M. A média  $\pm$  DP do peso deste grupo foi de  $28,3\text{g} \pm 1,0\text{g}$ .

**Grupo Pb:** no qual 10 camundongos Balb/C foram tratados com água destilada. A média  $\pm$  DP do peso deste grupo foi de  $25,7\text{g} \pm 1,3\text{g}$ .

Avaliou-se a influência da talidomida, da sacarose e da talidomida com sacarose nos diferentes parâmetros analisados, como a sobrevivência, o peso, o hematócrito e a parasitemia dos camundongos Balb/C. Para avaliar a influência da talidomida nestes parâmetros, comparamos os grupos Pb x Pb+T e Pb+S x Pb+T+S. Para avaliar a influência da sacarose sobre estes parâmetros, comparamos os grupos Pb x Pb+S e Pb+T x Pb+T+S. Para avaliar a influência do tratamento com talidomida diluída em sacarose, comparamos os grupos Pb x Pb+T+S.

Para os camundongos Balb/C, quando comparamos o peso inicial do grupo Pb com Pb+T e Pb+S com Pb+T+S, não houve diferença na média de peso ( $p=0,76$  e  $0,34$ , teste  $t$ , respectivamente). Porém, a comparação do peso

inicial do grupo Pb com Pb+T+S, Pb com Pb+S e Pb+T com Pb+T+S demonstrou diferença na média de peso inicial ( $p=0,009$ ,  $0,0001$  e  $0,05$ , teste  $t$ , respectivamente).

Os sinais clínicos dos camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA foram observados durante toda a curva de sobrevivência. Os animais apresentaram sinais de debilidade geral, como eriçamento de pêlo, apatia e sinais clínicos de anemia, como palidez de mucosas e dispnéia, semelhantes aos sinais previamente descritos para este modelo experimental (Grau e cols, 1987; Pierrot e cols, 2003)

A divisão dos grupos de camundongos CBA foi realizada da seguinte maneira:

**Grupo Pb+T+S:** no qual 8 camundongos CBA foram tratados com 150 mg/kg/dia de talidomida (Fundação Ezequiel Dias – FUNED/BH) diluída em 100  $\mu$ L de solução de sacarose 0,8M. A média  $\pm$  DP para o peso deste grupo foi de 15,8g  $\pm$  2,2g.

**Grupo Pb+S:** no qual 8 camundongos CBA foram tratados com 100  $\mu$ L de solução de sacarose 0,8M. A média  $\pm$  DP para o peso deste grupo foi de 16,1g  $\pm$  2,5g.

Avaliou-se a influência da talidomida nos animais tratados com sacarose para os diferentes parâmetros analisados, como a sobrevivência, o peso, o hematócrito e a parasitemia dos camundongos CBA. Para avaliar a influência da talidomida nestes parâmetros, comparamos os grupos Pb+S x Pb+T+S.

Para os camundongos CBA, quando comparamos o peso inicial do grupo Pb+S com Pb+T+S, não houve diferença na média de peso ( $p=0,77$ , teste t).

O dia da morte espontânea de cada animal foi computado, e a curva de sobrevivência, segundo Kaplan-Meier, foi construída para análise comparativa entre os grupos.

Os sinais clínicos dos camundongos CBA infectados pelo *P. berghei* ANKA foram observados durante toda a curva de sobrevivência. Os animais apresentaram sinais neurológicos, como ataxia, paraplegia dos membros em graus variados, paralisia, convulsão e coma, sendo que 25% dos animais não morreram com sinais de malária cerebral, mas com sinais de debilidade e anemia, assim como descrito por outros autores (Grau e cols, 1989; Carvalho e cols, 2000).

A parasitemia e o hematócrito foram realizados nos 4º, 9º, 15º, 21º, 28º e 32º dias de infecção, para os camundongos Balb/C, e nos 4º, 9º, 15º e 21º dias, para os camundongos CBA. O peso foi aferido diariamente.

### **3.6. Peso**

O peso dos camundongos foi aferido sempre pela manhã e utilizada a mesma balança com precisão de 0,01g (Ohaus portable-advanced).

### **3.7. Hematócrito**

Para avaliar a influência do tratamento com talidomida sobre o hematócrito, foi coletado sangue da ponta da cauda em capilar de vidro heparinizado e centrifugado em 700g durante 10 minutos.

### **3.8. Parasitemia**

Com o objetivo de avaliar a influência do tratamento com talidomida na parasitemia dos grupos infectados, confeccionou-se um distendido delgado em lâmina de sangue da ponta da cauda, corado com um kit rápido de coloração panótica (Newprov – Paraná – Brasil). Para a determinação da parasitemia, 500 eritrócitos foram contados por microscopia óptica com aumento de 1000X, utilizando-se um retículo de contagem adaptado à lente da ocular do microscópio.

### **3.9. Obtenção dos macrófagos peritoneais**

No oitavo dia do experimento, os animais eram anestesiados com éter etílico, o sangue total era coletado por enucleação do globo ocular e os animais sacrificados por deslocamento cervical. Após a anti-sepsia da parede abdominal com álcool 70%, pequena incisão era feita, suficiente para acessar a cavidade abdominal, e através dela, com pipeta Pasteur estéril, lavava-se o abdômen com 15 mL STF, 0,15M, estéril, pH 7,2, gelado, com o objetivo de coletar os macrófagos peritoneais.

O líquido recuperado 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, pH 7,2 (Sigma, EUA), acrescido de 20 mM de HEPES (Sigma, EUA), 26,4 ml/L de NaHCO<sub>3</sub> a 7,5% e 25 mg/L de gentamicina. Logo após, as células eram quantificadas e a viabilidade era avaliada em câmara de Neubauer, utilizando solução de nigrosina a 0,05% na

proporção de 1:5. Após isto, as células eram novamente suspensas em RPMI 1640, pH 7,2, para serem utilizadas nos vários testes funcionais (Muniz-Junqueira e cols, 1992).

### **3.10. Determinação da capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais**

A fagocitose era feita em placa Linbro de 24 escavações, estéril (TPP – Zellkultur Testplate – Suíça), contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro. Após obtenção e quantificação dos macrófagos como acima descrito,  $2 \times 10^5$  macrófagos suspensos em 500  $\mu$ l de RPMI 1640, pH 7,2, sem soro fetal bovino, eram distribuídos por escavação e as placas eram incubadas por 2 horas em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar para permitir a aderência dos macrófagos.

Após a incubação, as escavações eram lavadas com STF, pH 7,2, a 37°C, para remoção das células não aderidas e, em seguida, as preparações eram novamente incubadas por 30 minutos, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, com uma suspensão de  $10^6$  ou  $4 \times 10^6$  *Saccharomyces cerevisiae* em 500  $\mu$ l de RPMI 1640, pH 7,2, a 37°C, com 10% de soro fetal bovino (SFB). As leveduras eram previamente sensibilizadas pela incubação por 30 minutos a 37°C com 10% de SFB, inativado a 56°C, ou com pool de soro fresco de camundongos a 10%.

Após este período, as escavações eram lavadas com STF, pH 7,2, a 37°C, com 10% de SFB, para retirar as leveduras não ingeridas ou fortemente aderidas aos macrófagos. A última lavagem era feita com RPMI 1640, pH 7,2,

contendo 20% de SFB, para melhor preservar as preparações. Em seguida, as lamínulas eram secas com vento quente, fixadas por 1 minuto com metanol e coradas com solução de Giemsa a 10% em tampão para coloração, pH 7,2, por 10 minutos.

As lamínulas eram montadas em lâminas para microscopia com depex (BDH) e 200 células de cada preparação eram examinadas com aumento de 1000X. O índice fagocitário (IF) foi calculado pela multiplicação da média do número de leveduras ingeridas ou fortemente aderidas por macrófagos (A) pelo número de macrófagos envolvidos na fagocitose (B), e os dados foram expressos por 100 macrófagos (Shaw e Griffin, 1981). A fórmula para este cálculo é  $IF = A \times B$ .

### **3.11. Preparação de leveduras para o teste de fagocitose**

Para a preparação das leveduras foi utilizada a técnica de Lachman e Hobart (1978), que modifica a superfície do *Saccharomyces cerevisiae* para facilitar a adsorção da proteína C3 do complemento. Brandi (1993) demonstrou que, por esta técnica de preparação das leveduras, os anticorpos normalmente presentes no soro podem se adsorver nas partículas de leveduras.

A suspensão estoque de leveduras foi preparada dissolvendo 50 g de fermento fresco (Fleishmann) em 220 mL de STF, pH 7,2. Esta suspensão foi autoclavada a 120°C por 30 minutos e, em seguida, lavada com STF até obter-se um sobrenadante límpido. O sedimento foi suspenso em 28 ml de STF contendo 0,1M de 2-mercaptoetanol, incubado a 37°C por 2 horas, em agitação constante, e, em seguida, lavada três vezes com STF para retirar o 2-

mercaptoetanol. Após a lavagem, o sedimento foi suspenso em 55 ml de solução de iodoacetoamida a 0,02M em STF.

Novamente, a preparação foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente, lavada três vezes por centrifugação em STF, sendo ressuspensa posteriormente em 220 mL de STF. As leveduras foram, então, submetidas a uma nova autoclavagem por 30 minutos a 120°C, lavadas por centrifugação até se obter o sobrenadante límpido e a preparação suspensa em 10 mL de tampão veronal, pH 7,2, contendo azida sódica (2000 mg/L) como preservativo. A solução estoque era mantida estéril a 4°C, podendo ser utilizada por anos.

### **3.12. Preparação do *pool* de soro fresco para avaliação da fagocitose facilitada por opsoninas**

No momento do sacrifício dos animais, coletava-se sangue do plexo ocular e após centrifugação, utilizava-se o soro fresco murino a 10% como fonte de complemento. Portanto, a fagocitose das leveduras foi avaliada tanto na presença quanto na ausência de opsoninas, e todo o restante do procedimento foi realizado conforme o teste de fagocitose descrito no item 3.10.

### **3.13. Produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais**

A produção do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi quantificada no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais, após 1h de incubação,



pela microtécnica de oxidação do vermelho de fenol pela peroxidase na presença de  $H_2O_2$  (Pick e Mizel, 1981).

Após coleta e processamento dos macrófagos como descrito nos itens 3.9 e 3.10,  $1,5 \times 10^5$  células em 200  $\mu$ l de RPMI 1640, pH 7,2, sem soro fetal bovino eram distribuídas, em triplicata, por escavação, em placas estéreis de cultura de 96 escavações, de fundo chato (TPP – Zellkultur Testplate – Suíça). A placa era incubada por 1 hora em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de  $CO_2$  em ar, para a aderência dos macrófagos. Após incubação, as escavações eram lavadas 3 vezes com STF, pH 7,2, a 37 °C, e incubadas com vermelho de fenol a 1% e peroxidase tipo 1 RZ 1.3, correspondendo a 19 unidades de purpurogalina/mL (Sigma, EUA), na presença ou não de 20 nM de acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma, EUA), por 60 minutos, em câmara úmida, a 37°C, contendo 5% de  $CO_2$  em ar. A reação era interrompida com 10  $\mu$ l de NaOH 1N e, em seguida, a leitura era realizada em espectrofotômetro de placa (Biorad) com filtro de 590 nm. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em micromoles de  $H_2O_2$  ( $\mu$ M).

### **3.14. Curva-padrão para a determinação do peróxido de hidrogênio**

A curva-padrão para os experimentos de  $H_2O_2$  foi preparada a partir de uma solução estoque de  $H_2O_2$  (Sigma, EUA) na concentração de 10 mM diluída seriadamente na proporção de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400, respectivamente, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 6,25  $\mu$ M, 3,12  $\mu$ M e 1,56  $\mu$ M, com vermelho de fenol acrescido de peroxidase, correspondendo a 19

unidades de purpurogalina/mL. O padrão 0  $\mu\text{M}$  foi preparado com vermelho de fenol sem peroxidase. A curva foi então distribuída em triplicata na placa de 96 escavações, logo após a última incubação referida no item 3.12 e anteriormente ao acréscimo de NaOH 1N.

### **3.15. Padronização da dose ótima de acetato de forbol miristato (PMA) para determinar a produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos**

Para a determinação da curva de dose-resposta mais adequada para a utilização nos experimentos de peróxido de hidrogênio foram coletados um *pool* de macrófagos peritoneais de 3 camundongos Swiss, em STF, gelada, centrifugados a 4°C em 200g, durante 10 minutos, quantificados em câmara de Neubauer e ressuspensos para  $1,5 \times 10^5$  células em 200  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C sem soro fetal bovino e distribuídos em placas estéreis de cultura de 96 escavações de fundo chato. A placa foi incubada por 1 hora em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  em ar, para a aderência dos macrófagos. Após incubação, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF, pH 7,2, a 37°C, e incubadas sem ou com as concentrações de 0,2 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 200 nM e 2000 nM de PMA e na presença de vermelho de fenol a 1% e peroxidase tipo 1 RZ 1.3, correspondendo a 19 unidades de purpurogalina/mL, por 60 minutos, em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  em ar. A reação foi interrompida com 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 1N e, em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa (Biorad) com

filtro de 590 nm. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em densidade óptica (DO). A solução de vermelho de fenol foi preparada utilizando-se 19 unidades de purpurogalina/mL e a curva-padrão foi preparada conforme descrito anteriormente.

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais apresentaram, após estímulo com PMA, a média  $\pm$  DP (DO) da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0,307  $\pm$  0,010 quando utilizada a concentração de 0,2 nM; de 0,311  $\pm$  0,005 para 10 nM; de 0,343  $\pm$  0,001 para 20 nM; de 0,276  $\pm$  0,032 para 40 nM; de 0,341  $\pm$  0,001 para 80 nM; de 0,338  $\pm$  0,001 para 200 nM; e de 0,335  $\pm$  0,009 para 2000 nM. Os estímulos com 20 nM e 80 nM apresentaram as melhores respostas. Como as concentrações de 40 nM, 200 nM e 2000 nM apresentaram uma média mais baixa, estando o estímulo de 80 nM entre elas, foi padronizado utilizar, nos experimentos, 20 nM de PMA por escavação, para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio.

### **3.16. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais**

A produção de óxido nítrico (ON) pelos macrófagos peritoneais foi avaliada de forma indireta no sobrenadante das culturas utilizando a reação de Griess (Green e cols, 1981), uma vez que esta molécula é instável e rapidamente decomposta em nitrato e nitrito.

Após coleta e processamento dos macrófagos como descrito no item 3.9 e 3.10,  $1,5 \times 10^5$  macrófagos em um volume final de 200  $\mu$ l de RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C, sem soro fetal bovino eram distribuídos, em triplicata, em placas estéreis de cultura com 96 escavações de fundo chato (TPP – Zellkultur

Testplate – Suíça). Os macrófagos eram, então, incubados por 1 hora em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, para a etapa de aderência.

Após incubação, as escavações eram lavadas 1 vez com STF, pH 7,2, a 37°C, depois incubadas por 24 horas com ou sem estímulos diluídos em um volume final de 200 µl de RPMI 1640, pH 7,2, a 37°C, com 10% de soro fetal bovino. Além da produção basal de ON, estímulos foram adicionados às escavações, em triplicata, para se avaliar também a produção de ON pelos macrófagos após estimulação. Os estímulos utilizados foram 10 µg/ml de LPS (Sigma, EUA), ou 10 ng/ml de IFN- $\gamma$  (Sigma, EUA), ou, ainda, ambos os estímulos combinados.

Após 24 horas de incubação, a placa era centrifugada por 10 minutos a 200g e 100 µl do sobrenadante das culturas eram transferidos para outra placa, onde 100 µl do reagente de Griess (1-N naftiletileno diamina dihidroclorido a 0,1%, sulfanilamida a 1% e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 2,5%) era adicionado a cada escavação. A reação era imediatamente lida em espectrofotômetro de placa (Biorad) em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em micromolar (µM).

### **3.17. Curva padrão para determinação da produção de óxido nítrico**

A curva-padrão para os experimentos de óxido nítrico foi elaborada a partir da diluição seriada de uma solução de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) 200 µM na proporção de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128, respectivamente, 100

$\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$ , 3,12  $\mu\text{M}$  e 1,56  $\mu\text{M}$  com água destilada. O padrão 0  $\mu\text{M}$  foi preparado somente com água destilada.

### **3.18. Padronização da dose ótima de lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- $\gamma$ (INF- $\gamma$ ) para avaliar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos**

Para se determinar a concentração ótima de interferon- $\gamma$  e lipopolissacarídeo, para serem utilizadas nos experimentos para determinação do óxido nítrico, foram coletados um *pool* de macrófagos peritoneais de 3 camundongos Swiss, em STF, gelada, centrifugados a 4°C em 200g, durante 10 minutos, quantificados em câmara de Neubauer e distribuídos  $1,5 \times 10^5$  células por escavação em 200  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C, sem soro fetal bovino, em placas de cultura de 96 escavações, estéreis.

Após a aderência em lâmina, os macrófagos foram incubados por 24 horas, na ausência ou na presença de LPS (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e/ou INF- $\gamma$  (1  $\text{ng}/\text{mL}$ , 5  $\text{ng}/\text{mL}$ , 10  $\text{ng}/\text{mL}$  e 20  $\text{ng}/\text{mL}$ ). A produção de ON foi avaliada como acima descrito.

Para os macrófagos que foram submetidos ao estímulo com LPS, a média  $\pm$  DP (DO) da produção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas foi de  $598 \pm 13$  para a concentração de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $591 \pm 24$  para 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e  $567 \pm 6$  para 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Quando o estímulo utilizado foi o INF- $\gamma$ , a média  $\pm$  DP da DO foi de  $571 \pm 10$  para a concentração de 1  $\text{ng}/\text{mL}$ ,  $594 \pm 6$  para 5  $\text{ng}/\text{mL}$ ,  $594 \pm 0$  para 10  $\text{ng}/\text{mL}$  e  $585 \pm 5$  para 20  $\text{ng}/\text{mL}$ . Como as concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS e 5 e 10  $\text{ng}/\text{mL}$  de INF- $\gamma$  produziram as maiores respostas,

acrescentamos às culturas de macrófagos peritoneais os dois estímulos simultaneamente. A média  $\pm$  DP da DO foi de  $622 \pm 9$  quando utilizadas as concentrações de 5  $\mu\text{g/mL}$  de LPS com 5  $\text{ng/mL}$  de  $\text{INF-}\gamma$ ; de  $599 \pm 8$  quando utilizado 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS com 5  $\text{ng/mL}$  de  $\text{INF-}\gamma$ ; de  $598 \pm 6$  quando utilizado 5  $\mu\text{g/mL}$  de LPS com 10  $\text{ng/mL}$  de  $\text{INF-}\gamma$ ; e de  $620 \pm 5$  quando utilizado 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS com 10  $\text{ng/mL}$  de  $\text{INF-}\gamma$ . Como o melhor resultado foi o do estímulo com 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS e 10  $\text{ng/mL}$  de  $\text{INF-}\gamma$ , foi padronizado utilizar estas concentrações nos experimentos para avaliação da produção do óxido nítrico.

### **3.19. Produção de fator de necrose tumoral (FNT) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais e mensuração no soro dos camundongos**

Através de um método de imunoenensaio enzimático (ELISA) (Ms  $\text{TNF-}\alpha$ , BioSource, Bélgica), avaliou-se a produção de FNT nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais e nas amostras de soro dos camundongos que foram coletadas sem anticoagulante no oitavo dia de infecção. Após coagulação espontânea, a amostra era centrifugada para obtenção de soro e mantida a  $-70^\circ\text{C}$  até a determinação do FNT.

Os macrófagos eram coletados e processados como descrito nos itens 3.9 e 3.10, e  $2 \times 10^5$  células eram distribuídas por escavação em 500  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640, pH 7,2, a  $4^\circ\text{C}$ , sem soro fetal bovino. A placa era, então, incubada por 2 horas em câmara úmida, a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  em ar, para a adesão dos macrófagos. Após incubação, as escavações eram lavadas 3 vezes com STF, pH 7,2, a  $37^\circ\text{C}$ , e os macrófagos incubados por 6 horas

(Matic e Simon, 1991; Coelho, 2003), com ou sem 1 µg/mL de LPS (Otterlei e cols, 1991), em RPMI 1640, pH 7,2, a 37°C, com 10% de soro fetal bovino. Após incubação, a placa era centrifugada e 200 µL dos sobrenadantes recuperados, acondicionados em eppendorfs e mantidos a -70°C até a determinação do FNT.

As amostras de soro e sobrenadante foram testadas no mesmo ensaio, após descongelamento prévio até a temperatura ambiente.

A determinação do FNT foi realizada conforme instruções do fabricante. Os padrões foram acrescentados em todas as placas nas concentrações de 1250, 625, 321,5, 156,2, 78,1, 39,1, 19,5 e 0 pg/mL. As amostras de soro foram diluídas ao meio com tampão de incubação e os sobrenadantes das culturas foram diluídos ao meio com tampão diluente dos padrões, distribuídas nas placas contendo anticorpos policlonais anti-FNT adsorvidos nas paredes. Após incubação por 90 minutos em temperatura ambiente, com um segundo anticorpo monoclonal biotilado para FNT de camundongo, as escavações foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com 100 µL de uma solução de estreptavidina-peroxidase. Uma segunda lavagem foi realizada 4 vezes com solução de lavagem e a placa foi novamente incubada em temperatura ambiente, na ausência da luz, durante 30 minutos, acrescida de 100 µL do cromógeno estabilizado (tetrametilbenzidina) em cada escavação. Após este período 100 µL da solução de interrupção foram adicionadas às escavações e a reação colorimétrica produzida foi avaliada utilizando um espectrofotômetro de placa (Titertek) com filtro de 430 nm e a concentração expressa em pg/mL.

### 3.20. Análise estatística

Previamente à aplicação dos testes estatísticos as variáveis foram analisadas quanto à normalidade das amostras. Para análise comparativa entre mais do que duas variáveis não relacionadas, com distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA, seguido do método de Student-Newmann-Keuls. Para comparação múltipla entre os grupos e para aquelas com distribuição não normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do método de Dunn.

Para comparação entre duas variáveis não correlacionadas com distribuição normal foi utilizado o teste *t* de Student, e para as amostras com distribuição não normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Considerando-se que a maioria das variáveis exibiu distribuição não gaussiana, os resultados foram uniformemente representados por meio da mediana, quartis e extremos.

O teste de correlação de Spearman foi utilizado para verificar a correlação entre as variáveis não paramétricas e o teste de correlação de Pearson para variáveis paramétricas.

Para analisar a influência sobre a mortalidade nos grupos tratados ou não com a talidomida foi realizada a curva de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística foi avaliada pelo teste de Logrank.

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

As análises foram realizadas empregando-se o software Graphpad Prism 4 for Windows (Graphpad Software – San Diego, USA).



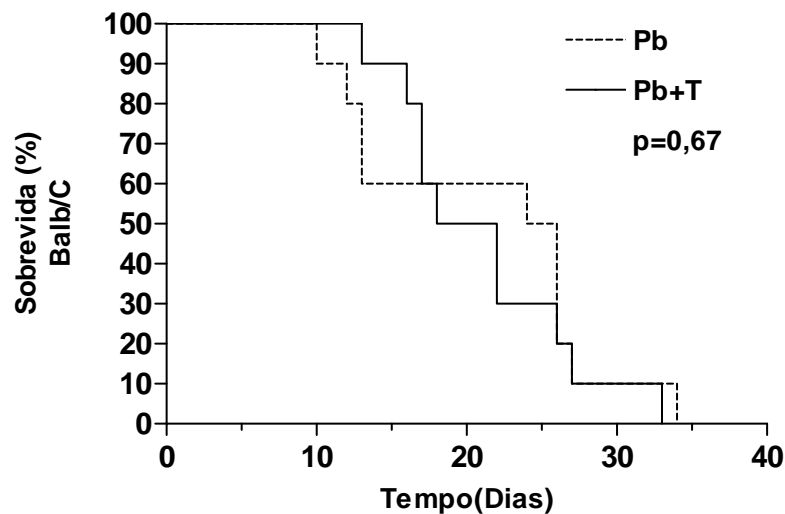
## **RESULTADOS**

## 4.1 Curva de mortalidade

### 4.1.1 Influência da talidomida sobre a sobrevivência de camundongos Balb/C infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA

Para verificar a influência da talidomida sobre a sobrevivência dos animais maláricos foi analisada a mortalidade espontânea dos camundongos Balb/C após a infecção com *P. berghei* ANKA, por meio de uma curva de mortalidade computando diariamente o número de animais que morreram ao longo do tempo entre os grupos infectados com *Plasmodium berghei* Anka e tratados (Pb+T, n=10) ou não (Pb, n=10) com talidomida.

Embora tenha havido um retardo de 3 dias no início da morte dos animais do grupo Pb+T, não observamos alteração no tempo total de sobrevivência dos animais, sendo que os animais do grupo Pb morreram um dia após os animais tratados com talidomida. Os animais não tratados começaram a morrer no décimo dia de infecção enquanto que os tratados apenas no décimo terceiro dia. No vigésimo dia de infecção, 50% dos animais do grupo Pb e 70% dos animais do grupo Pb+T haviam morrido. Com 27 dias de infecção, 90% dos animais dos dois grupos estavam mortos, sendo que no trigésimo terceiro dia de infecção morreu o último animal do grupo Pb+T, enquanto que o último animal do grupo Pb morreu no trigésimo quarto dia de infecção. A curva de sobrevivência foi feita pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística avaliada pelo teste de Logrank ( $p=0,67$ , **figura 2**).

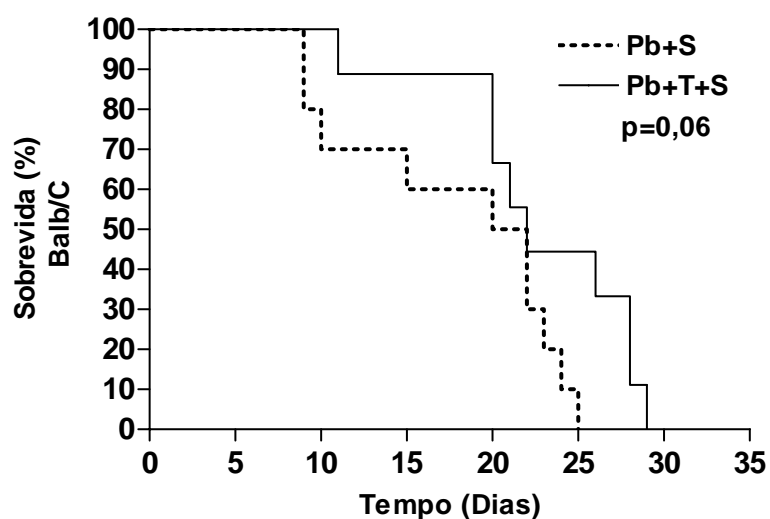


**Figura 2.** Influência da talidomida na sobrevivência de camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados com talidomida — (Pb+T, n=10) ou água destilada ----- (Pb, n=10). A curva de sobrevivência foi estabelecida pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística avaliada pelo teste de Logrank ( $p=0,67$ ).

Para verificar a influência da talidomida quando os animais infectados estavam usando concomitantemente sacarose foi avaliada também a sobrevivência comparando os grupos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com talidomida e sacarose (Pb+T+S, n=9) ou apenas com sacarose (Pb+S, n=10).

Observamos que no grupo tratado apenas com a sacarose (Pb+S) os animais começaram a morrer no nono dia da infecção, enquanto que no grupo tratado também com a talidomida (Pb+T+S) os animais começaram a morrer com onze dias de infecção. Com vinte dias de infecção, 50% dos animais do grupo Pb+S e 33,4% dos animais do grupo Pb+T+S haviam morrido. No vigésimo quinto dia de infecção, todos os animais (100%) do grupo tratado apenas com sacarose (Pb+S) já haviam morrido, enquanto apenas 55,6% dos animais do grupo tratado com talidomida e sacarose (Pb+T+S) estavam mortos. No trigésimo dia de

infecção todos os animais deste último grupo (Pb+T+S) já haviam morrido. O tratamento com talidomida dos animais utilizando sacarose aumentou em dois dias o início da morte e em cinco dias a sobrevivência dos animais em relação aos que foram tratados apenas com a sacarose, de acordo com a curva de sobrevivência feita pelo método de Kaplan-Meier, sendo a diferença estatística analisada pelo teste de Logrank ( $p=0,06$ , **figura 3**).



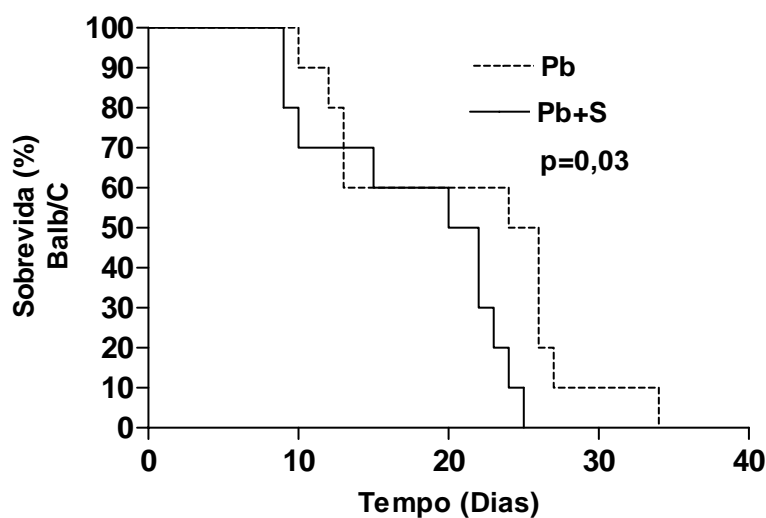
**Figura 3.** Influência do tratamento com talidomida sobre a sobrevivência de camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA utilizando concomitantemente sacarose. Os animais foram tratados com talidomida em sacarose ----- (Pb+T+S, n=9) ou com sacarose — (Pb+S, n=10). A curva de sobrevivência foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística avaliada pelo teste de Logrank ( $p=0,06$ ).

#### 4.1.2 Influência da sacarose sobre a sobrevivência de camundongos Balb/C infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA

Para avaliar a influência da sacarose na mortalidade espontânea durante a infecção malárica em camundongos Balb/C, dois grupos foram infectados e

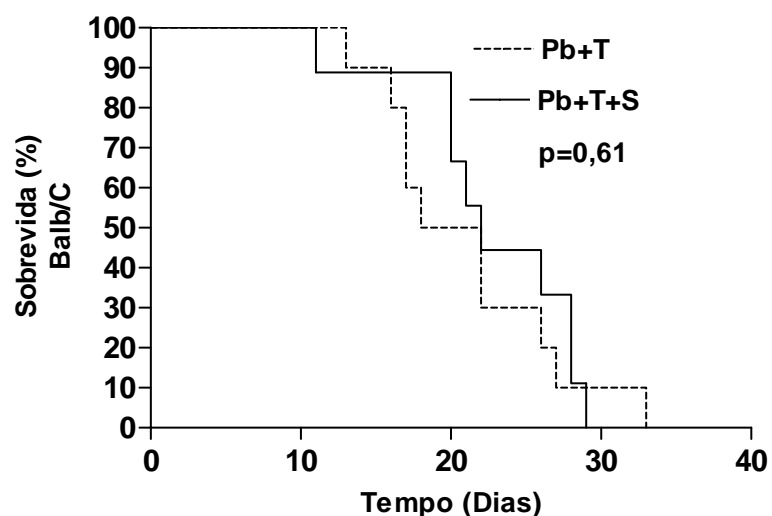
tratados (Pb+S, n=10) ou não (Pb, n=10) com sacarose.

Observamos que a utilização de sacarose isoladamente diminuiu a sobrevivência dos animais infectados no grupo tratado com sacarose (Pb+S) os animais começaram a morrer no nono dia da infecção, enquanto que no grupo que não utilizou o açúcar (Pb) os animais começaram a morrer a partir do décimo dia da infecção. No décimo quinto dia, 40% dos animais dos dois grupos haviam morrido. No vigésimo quinto dia, 50% dos animais do grupo Pb e 100% dos animais do grupo tratado com sacarose (Pb+S) haviam morrido. Com trinta e quatro dias de infecção, todos os animais do grupo Pb já haviam morrido. Os animais que não utilizaram a sacarose tiveram um retardo de um dia no início da morte e de nove dias na sobrevivência. A curva de sobrevivência foi feita pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística pelo teste de Logrank ( $p=0,03$ , **figura 4**).



**Figura 4.** Influência da sacarose sobre a sobrevivência de camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA. Os animais foram tratados com sacarose — (Pb+S, n=10) ou água destilada ----- (Pb, n=10). A curva de sobrevivência foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística foi avaliada pelo teste de Logrank ( $p=0,03$ ).

Para avaliar se a sacarose teve alguma influência na resposta dos animais infectados e tratados com talidomida foram estudados camundongos infectados e tratados com talidomida utilizando (Pb+T+S, n=9) ou não (Pb+T, n=10), concomitantemente, a sacarose. Observamos que os animais do grupo tratado com a sacarose (Pb+T+S) começaram a morrer com onze dias de infecção, enquanto que os animais do grupo que não utilizou a sacarose (Pb+T) começaram a morrer com treze dias de infecção. No décimo oitavo dia, 50% dos animais do grupo Pb+T e 11,2% dos animais do grupo Pb+T+S haviam morrido. No vigésimo quinto dia de infecção, 70% dos animais do grupo Pb+T e 66,7% dos animais do grupo Pb+T+S estavam mortos. Após 29 dias de infecção, todos os animais do grupo Pb+T+S estavam mortos enquanto que animais do grupo Pb+T sobreviveram até o trigésimo terceiro dia da infecção. Embora a associação de sacarose ao tratamento com talidomida tenha adiantado em dois dias o início da morte e diminuído em quatro dias a sobrevivência, não houve diferença estatística entre os grupos tratados com talidomida associada ou não à sacarose. A curva de sobrevivência foi feita pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística foi avaliada pelo teste de Logrank ( $p=0,61$ , **figura 5**).



**Figura 5.** Influência da sacarose na sobrevivência de camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados concomitantemente com talidomida. Os animais foram tratados com talidomida e sacarose — (Pb+T+S, n=9) ou apenas com talidomida ----- (Pb+T, n=10). A curva de sobrevivência foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística avaliada pelo teste de Logrank ( $p=0,61$ ).

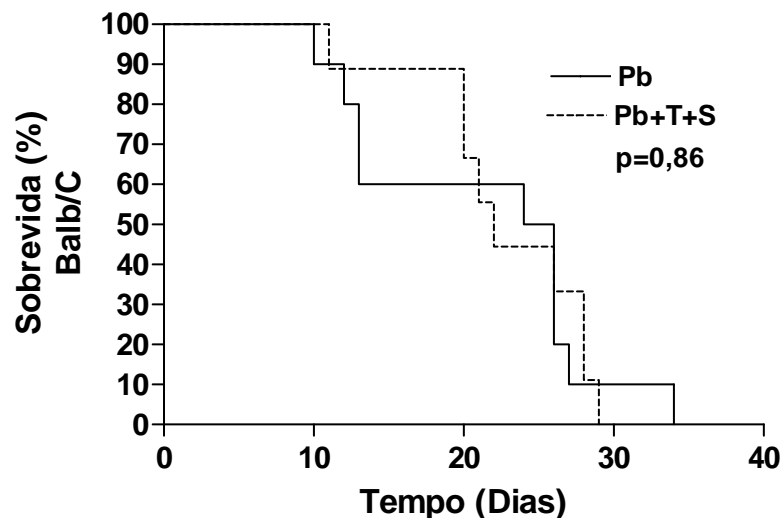
#### 4.1.3 Influência da talidomida diluída em sacarose sobre a sobrevivência dos camundongos Balb/C infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA

Para verificar a influência da talidomida diluída em sacarose na sobrevivência, dois grupos de camundongos Balb/C foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S, n=9) ou não (Pb, n=10), e foi avaliada a mortalidade espontânea.

No grupo Pb, o início da morte ocorreu com 10 dias de infecção, enquanto que no grupo Pb+T+S os animais começaram a morrer no décimo primeiro dia da infecção. Com 20 dias, 40% dos animais do grupo Pb e 34% dos animais do grupo

P+T+S já haviam morrido. Com 29 dias de infecção 100% dos animais do grupo Pb+T+S e 90% dos animais do grupo Pb estavam mortos. No trigésimo quarto dia da infecção todos os animais tratados com água destilada (Pb) estavam mortos.

O tratamento com talidomida em sacarose retardou em um dia o início da morte, entretanto não aumentou a sobrevivência dos camundongos Balb/C infectados. Não houve diferença estatística entre os grupos comparados. A curva de sobrevivência foi feita pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística foi avaliada pelo teste de Logrank ( $p=0,86$ , **figura 6**).

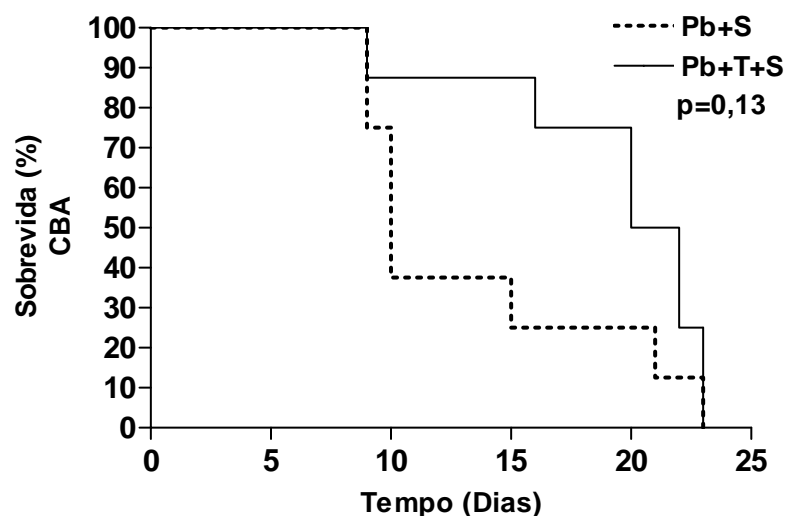


**Figura 6.** Influência do tratamento com talidomida diluída em sacarose sobre a sobrevivência de camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA. Os animais foram tratados com água destilada — (Pb, n=10) ou com talidomida em sacarose ----- (Pb+T+S, n=9). A curva de sobrevivência foi feita pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística avaliada pelo teste de Logrank ( $p=0,86$ ).



#### 4.1.4 Influência da talidomida sobre a sobrevivência dos camundongos CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA

Para os camundongos CBA, a curva de mortalidade espontânea foi realizada utilizando um grupo de camundongos infectados e tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S, n=8) e o outro tratado apenas com sacarose (Pb+S, n=8). Os animais dos dois grupos começaram a morrer no nono dia de infecção. No décimo sexto dia, 75% dos animais do grupo tratado apenas com a sacarose (Pb+S) e 25% dos animais do grupo tratado com a associação de talidomida com sacarose (Pb+T+S) haviam morrido. Não houve aumento da sobrevivência dos animais, uma vez que no vigésimo terceiro dia de infecção todos os animais, de ambos os grupos, morreram. A curva de porcentagem de sobrevivência cumulativa foi feita pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística foi avaliada pelo teste de Logrank ( $p=0,13$ , **figura 7**).



**Figura 7.** Influência do tratamento com talidomida diluída em sacarose na sobrevivência de camundongos CBA infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados com talidomida em sacarose — (Pb+T+S, n=8) ou com sacarose ----- (Pb+S, n=8). A curva de sobrevivência foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística foi avaliada pelo teste de Logrank ( $p=0,13$ ).

#### 4.2 Evolução do peso dos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA

Para avaliar a influência da talidomida, da sacarose e da combinação de ambas sobre a evolução do peso dos camundongos Balb/C na infecção malárica, 39 animais foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e separados em três grupos de tratamento: Grupo Pb+T, no qual 10 animais infectados com *Plasmodium berghei* foram tratados com talidomida em água destilada. Grupo Pb+T+S, no qual 9 animais infectados com *P. berghei* foram tratados com talidomida em solução de sacarose; Grupo Pb+S, no qual 10 animais infectados

com *P. berghei* receberam apenas sacarose. E, grupo Pb, no qual 10 animais infectados com *P. berghei* foram tratados com água destilada.

Dos camundongos CBA, 16 animais foram infectados pelo *P. berghei* ANKA, sendo que 8 animais foram tratados com talidomida diluída em solução de sacarose (Pb+T+S) e 8 animais foram tratados apenas com solução de sacarose (Pb+S).

Não houve diferença na média  $\pm$  DP do peso no dia zero entre os camundongos Balb/C infectados não tratados ou tratados com talidomida (Pb x Pb+T), e os grupos infectados tratados com sacarose ou com talidomida em sacarose (Pb+S x Pb+T+S) ( $p=0,76$  e  $0,34$ , teste *t*, respectivamente).

Porém, houve diferença entre os pesos dos animais no dia zero para os grupos infectados não tratados ou tratados com talidomida em sacarose (Pb x Pb+T+S), os grupos infectados não tratados ou tratados com sacarose (Pb x Pb+S) e os grupos infectados tratados com talidomida ou talidomida em sacarose (Pb+T x Pb+T+S) ( $p=0,009$ ,  $0,0001$  e  $0,05$ , teste *t*, respectivamente). Para permitir a comparação entre os grupos foi avaliada a variação percentual do peso ( $\Delta\% = \text{peso final (pf) menos o peso inicial (pi) dividido pelo peso inicial}$ ).

Não houve diferença na média  $\pm$  DP de peso no dia zero para os camundongos CBA ( $p= 0,77$ , pelo teste *t*).

Observou-se que a infecção malárica promoveu perda de peso progressiva independente do tratamento utilizado tanto nos camundongos Balb/C (Pb:  $p<0,0001$ , ANOVA e Pb+T, Pb+T+S e Pb+S:  $p<0,0001$ , Kruskal-Wallis, **figuras 8 e 9**) quanto nos camundongos CBA (Pb+T+S e Pb+S:  $p<0,0001$ , Kruskal-Wallis, **figura 13**).

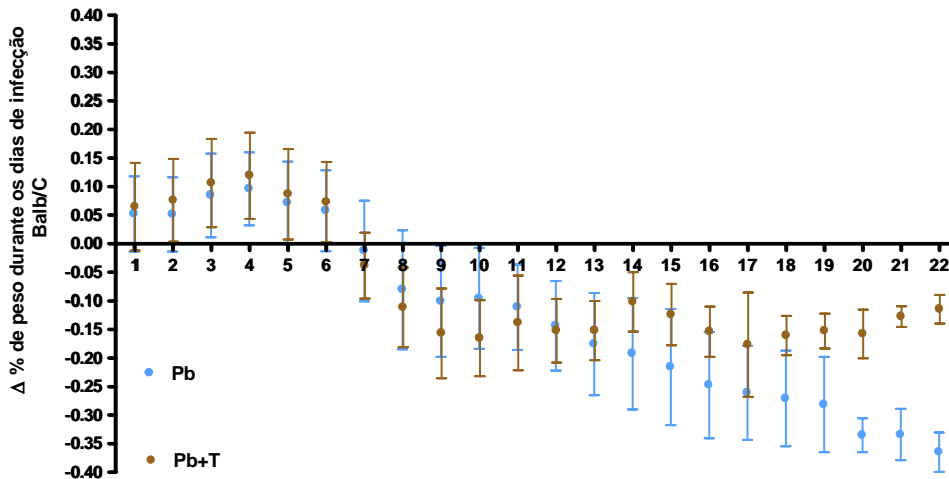
#### 4.2.1 Influência da talidomida na evolução do peso dos camundongos Balb/C

Quatro grupos de camundongos Balb/C foram infectados com o objetivo de avaliar a influência da talidomida na evolução do peso. Comparou-se a evolução do peso entre os grupos tratado (Pb+T, n=10) ou não com talidomida (Pb, n=10), e entre os grupos tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S, n=9) ou apenas com sacarose (Pb+S, n=10).

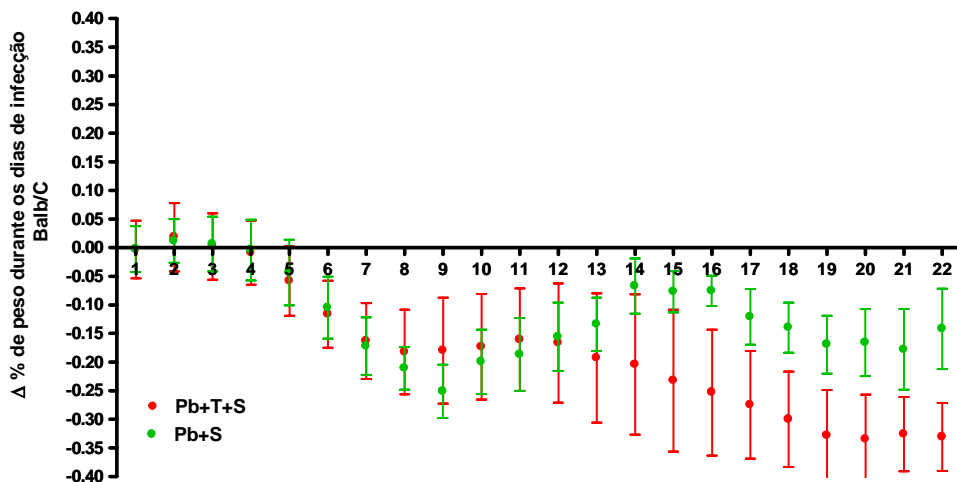
Com a utilização isolada da talidomida, observamos que esta droga foi capaz de diminuir a perda de peso dos animais maláricos. A partir do décimo quinto dia da infecção, os camundongos tratados somente com talidomida apresentaram uma menor perda de peso (média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$ : -0,124g $\pm$ 0,054g) em relação ao grupo não tratado (Pb) (média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$ : -0,216g $\pm$ 0,102g), sendo a diferença significativa a partir do décimo oitavo dia da infecção (média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  do grupo Pb: -0,271g $\pm$ 0,084g e média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  do grupo Pb+T: -0,161g $\pm$ 0,034g; p=0,041, teste *t*, **figura 8**).

Entretanto, quando esta droga foi diluída em solução de sacarose, observamos maior perda de peso dos animais tratados com a talidomida nas fases tardias da infecção. A perda de peso foi significativa a partir do décimo quarto dia de infecção para o grupo tratado com a talidomida e sacarose em relação ao grupo tratado apenas com sacarose (média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  do grupo Pb+T+S: -

0,204g±,122g e média ± DP do  $\Delta\%$  do grupo Pb+S:  $-0,067\pm 0,048g$ ;  $p=0,016$ , teste  $t$ , figura 9).



**Figura 8.** Variação percentual do peso dos camundongos Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA tratado (Pb+T) ou não (Pb) com talidomida. Até o décimo sétimo dia de infecção não houve diferença estatística entre as médias ± DP do  $\Delta\%$  de peso ( $p>0,05$ , teste  $t$ ). Do décimo oitavo até o vigésimo segundo dia de infecção, o grupo Pb+T perdeu menos peso do que o grupo Pb ( $p<0,05$ , Mann-Whitney).



**Figura 9.** Variação percentual do peso dos camundongos Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S) ou apenas com sacarose (Pb+S). Até o décimo terceiro dia de infecção não houve diferença estatística entre as médias ± DP do  $\Delta\%$  de peso ( $p>0,05$ , teste  $t$ ). A partir do décimo quarto até o vigésimo segundo dia de infecção, o grupo Pb+S perdeu menos peso do que o grupo Pb+T+S ( $p<0,05$ , teste  $t$ ).

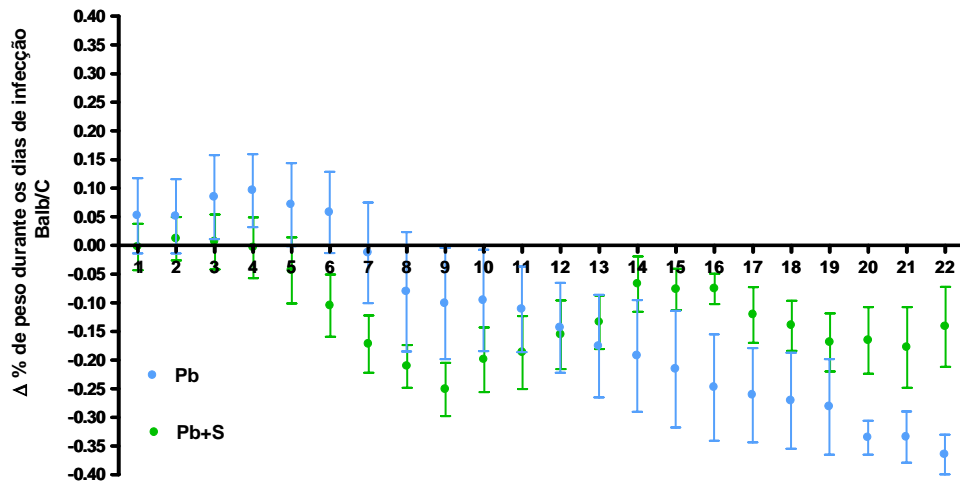
#### 4.2.2 Influência da sacarose na evolução do peso dos camundongos Balb/C

Para avaliar a influência da sacarose na evolução do peso dos camundongos Balb/C durante a infecção malárica, dois grupos foram infectados com *Plasmodium berghei* Anka e tratados da seguinte maneira: em um deles foi administrada solução de sacarose (Pb+S, n=10) e no outro foi administrada apenas água destilada (Pb, n=10). Dois outros grupos de animais infectados foram acrescentados, dos quais um foi tratado com talidomida diluída em água destilada (Pb+T, n=10) e no outro a talidomida foi diluída em sacarose (Pb+T+S, n=9).

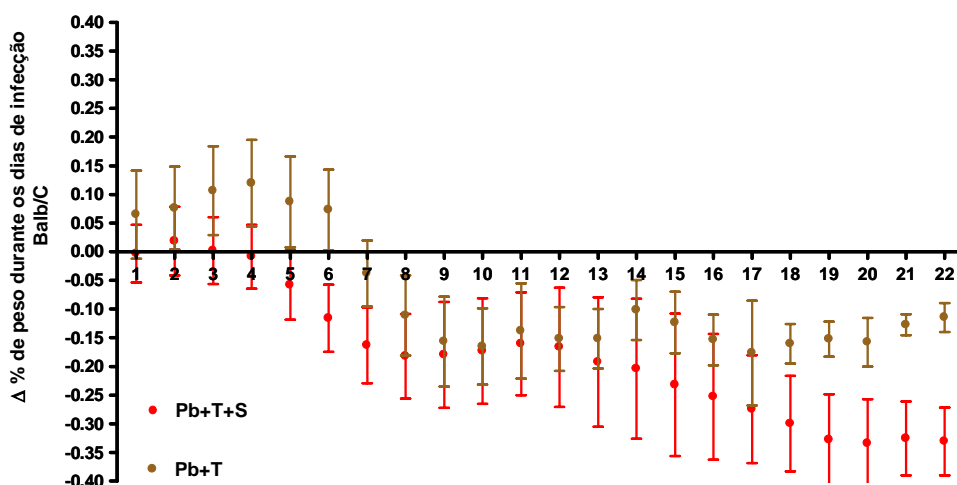
A utilização de sacarose isoladamente protegeu da perda de peso nas fases tardias da infecção, embora tenha aumentado a perda de peso nas fases iniciais da infecção malárica. Este grupo apresentou significativa perda de peso até o décimo primeiro dia da infecção (média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$ :  $-0,186\text{g}\pm 0,024\text{g}$ ) em relação ao grupo que recebeu apenas água (média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$ :  $-0,111\text{g}\pm 0,074\text{g}$ ) ( $p=0,052$ , teste  $t$ , **figura 10**). Não houve variação significativa da perda de peso nos décimo segundo e décimo terceiro dias ( $p>0,05$ , teste  $t$  e Mann-Whitney, respectivamente), porém, a partir do décimo quarto dia de infecção, o grupo que recebeu água apresentou maior perda de peso (média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$ :  $-0,192\text{g}\pm 0,039\text{g}$ ) do que grupo tratado com sacarose (média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$ :  $-0,067\text{g}\pm 0,063\text{g}$ ) ( $p=0,035$ , Mann-Whitney).

A talidomida diluída em sacarose agravou a perda de peso dos animais. Entre os terceiro e oitavo dias e a partir do décimo quarto dia de infecção, o grupo tratado com talidomida (Pb+T) apresentou menor perda de peso em relação ao

grupo tratado com talidomida em sacarose (Pb+T+S) (média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  nos 3°, 8° e 14° dias do grupo Pb+T: 0,106g $\pm$ 0,077g, -0,111g $\pm$ 0,069g e -0,101g $\pm$ 0,052g, respectivamente; média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  nos 3°, 8° e 14° dias do grupo Pb+T+S: 0,002g $\pm$ 0,058g, -0,182g $\pm$ 0,073g e -0,204g $\pm$ 0,122g, respectivamente;  $p < 0,05$ , Mann-Whitney, para os 3° e 8° dias, e teste  $t$  para o 14° dia, **figura 11**). Entre os nono e décimo terceiro dias não houve diferença na média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  do peso entre os animais dos grupos Pb+T+S e Pb+T.



**Figura 10.** Variação percentual do peso dos camundongos Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com sacarose (Pb+S) ou água destilada (Pb). Até o décimo primeiro dia de infecção Pb+S perdeu mais peso do que o grupo Pb ( $p < 0,05$ , teste  $t$ ). Não houve diferença estatística entre as médias  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  de peso nos décimo segundo e décimo terceiro dias ( $p > 0,05$ , teste  $t$  e Mann-Whitney). A partir do décimo quarto até o vigésimo segundo dia de infecção, o grupo Pb+S perdeu menos peso do que o grupo Pb ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney).



**Figura 11.** Variação percentual do peso dos camundongos Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S) ou com talidomida (Pb+T). Entre os terceiro e o oitavo dias e após o décimo quarto dia de infecção os animais do grupo Pb+T+S perderam mais peso do que o grupo Pb+T ( $p < 0,05$ , teste *t* e Mann-Whitney). Não houve diferença estatística entre as médias  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  de peso entre os nono e décimo terceiro dias ( $p > 0,05$ , teste *t* e Mann-Whitney).

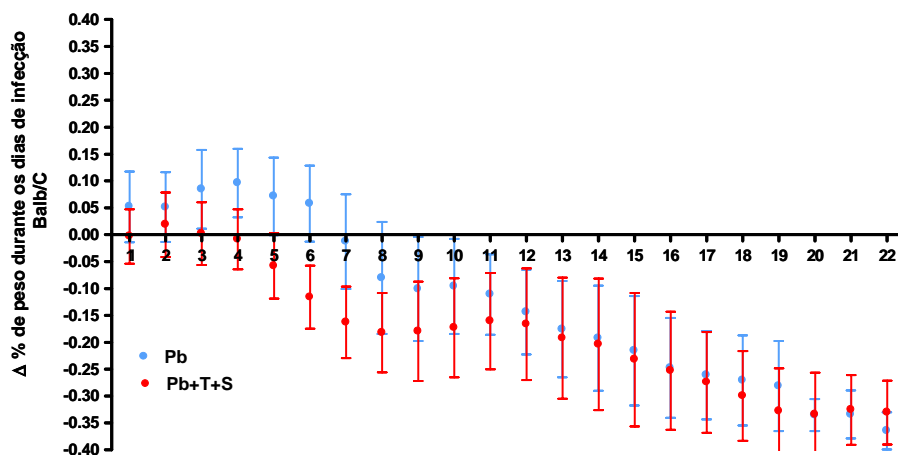
#### 4.2.3 Influência da talidomida diluída em sacarose na evolução do peso dos camundongos Balb/C

Para avaliar a influência da talidomida diluída em sacarose na variação do peso dos camundongos Balb/C na infecção malárica, dois grupos foram infectados, sendo um tratado com talidomida e sacarose (Pb+T+S,  $n=9$ ) enquanto que o outro grupo recebeu apenas água destilada (Pb,  $n=10$ ).

Houve menor perda de peso apenas entre o terceiro e o oitavo dias de infecção pelo grupo Pb (média do  $\Delta\%$  do grupo Pb nos 3º e 8º dias:  $0,084g \pm 0,073g$  e  $-0,080g \pm 0,104g$ , respectivamente; média do  $\Delta\%$  do grupo Pb+T+S nos 3º e 8º dias:  $0,002g \pm 0,058g$  e  $-0,182g \pm 0,073g$ ;  $p < 0,05$ , Mann-



Whitney, **figura 12**). A partir do décimo primeiro dia não se detectou diferença na perda de peso entre os dois grupos.



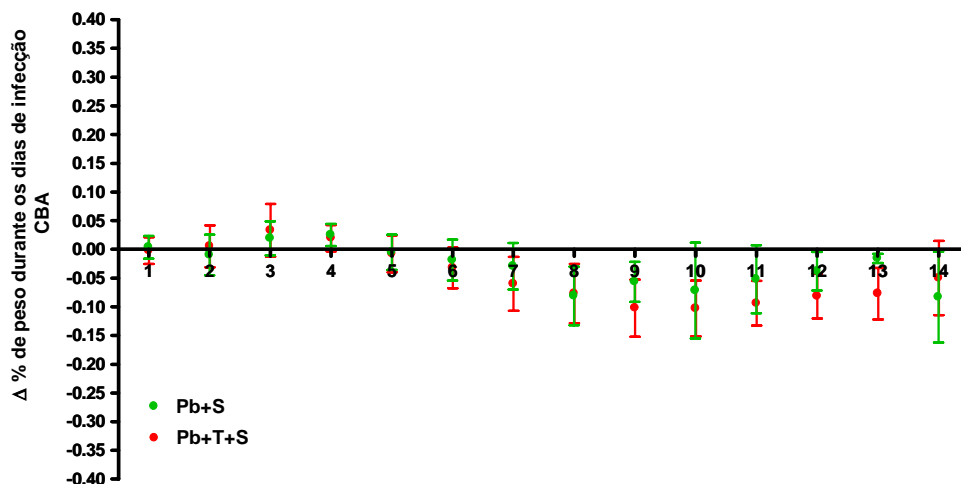
**Figura 12.** Variação percentual do peso dos camundongos Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S) ou água destilada (Pb). Entre os terceiro e o oitavo dias os animais do grupo Pb apresentaram menor perda de peso do que os do grupo Pb+T+S ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney e teste  $t$ ). A partir do nono dia de infecção não houve diferença na média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  do peso ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney e teste  $t$ ).

#### 4.2.4 Influência da talidomida na evolução do peso dos camundongos CBA

Para avaliar a influência da talidomida na variação do peso de camundongos CBA na infecção malárica, dois grupos foram infectados, sendo um tratado com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S,  $n=8$ ) enquanto que o outro grupo recebeu apenas sacarose (Pb+S,  $n=8$ ).

A talidomida aumentou a perda de peso nos nono e décimo terceiro dias de infecção malárica (média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  do grupo Pb+T+S nos 9° e 13° dias:  $-0,102g \pm 0,050g$  e  $-0,077g \pm 0,044g$ , respectivamente; média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  do grupo Pb+S nos 9° e 13° dias:  $-0,056g \pm 0,034g$  e  $-0,015g \pm 0,008g$ , respectivamente;

p=0,042 para o nono dia e p=0,016 para o décimo terceiro dia, Mann-Whitney, **figura 13**). Nenhum outro dia apresentou diferença na média do  $\Delta\%$  do peso.



**Figura 13.** Variação percentual do peso dos camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S) ou com sacarose (Pb+S). Nos nono e décimo terceiro dias os animais do grupo Pb+S apresentaram menor perda de peso do que os do grupo Pb+T+S ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney). Nos outros dias não houve diferença na média  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  do peso ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney e teste *t*).

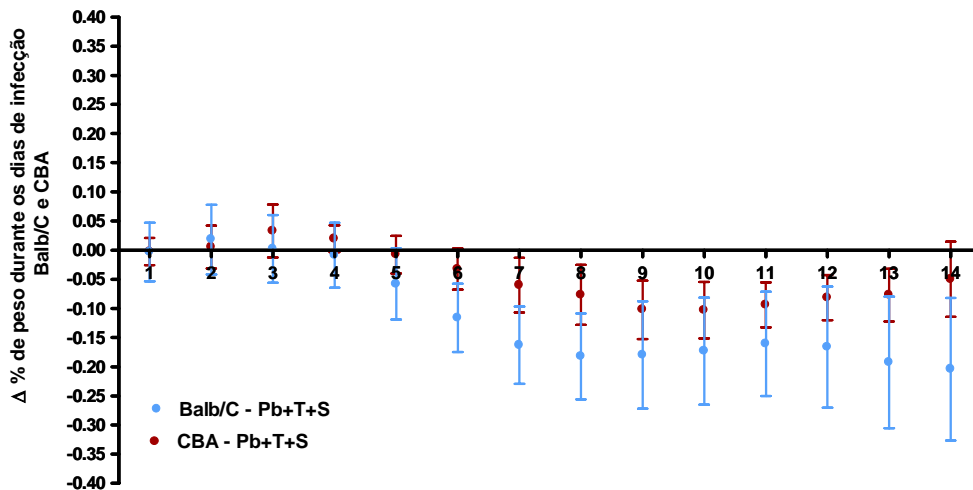
#### 4.2.5 Comparação da influência da talidomida na evolução do peso entre camundongos Balb/C e CBA

A evolução do peso dos camundongos Balb/C e CBA infectados e tratados com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S, n=9 e 8, respectivamente) ou somente com sacarose (Pb+S, n=10 e 10, respectivamente) também foram comparados.

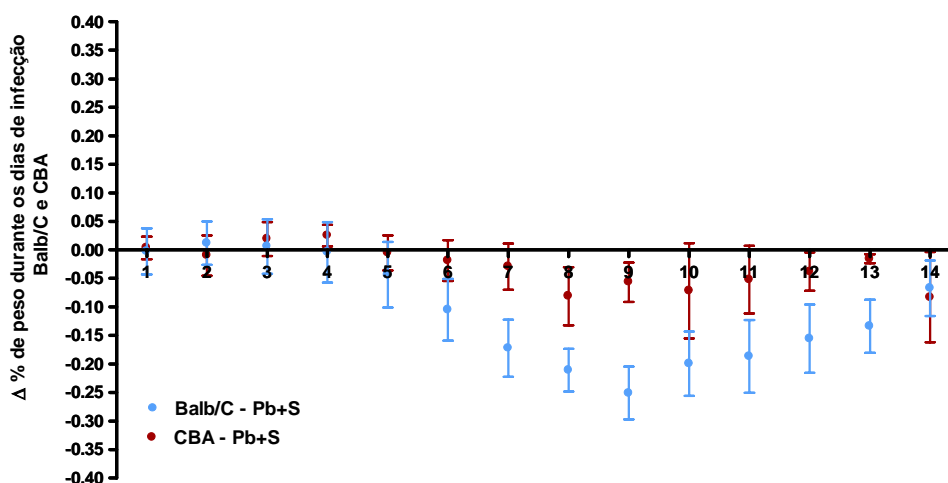
Os animais Balb/C tratados com talidomida em sacarose apresentaram maior perda de peso entre os quinto e oitavo dias e décimo terceiro e décimo

quarto dias de infecção em relação aos CBA submetidos ao mesmo tratamento ( $p < 0,05$ , teste  $t$  e Mann-Whitney, **figura 14**).

Os animais do grupo Balb/C tratados apenas com sacarose também perderam mais peso do que os camundongos CBA (Pb+S) submetidos ao mesmo tratamento, sendo a diferença significativa a partir do sexto até o décimo terceiro dia de infecção ( $p < 0,05$ , teste  $t$  e Mann-Whitney). Apenas no décimo quarto dia não houve diferença entre as médias  $\pm$  DP do  $\Delta\%$  do peso entre os camundongos Balb/C e CBA para o tratamento apenas com sacarose ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney, **figura 15**).



**Figura 14.** Variação percentual do peso dos camundongos Balb/C e CBA infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S,  $n=9$  e  $8$ , respectivamente). Entre os quinto e oitavo dias e no décimo terceiro e décimo quarto dias de infecção os camundongos Balb/C perderam mais peso que os CBA ( $p < 0,05$ , teste  $t$  e Mann-Whitney).



**Figura 15.** Variação percentual do peso dos camundongos Balb/C e CBA infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com sacarose (Pb+S, n=10 e 10, respectivamente). Entre os sexto e décimo terceiro dias de infecção os camundongos Balb/C perderam mais peso que os CBA ( $p < 0,05$ , teste *t* e Mann-Whitney).

#### 4.3 Evolução do hematócrito nos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA

Durante a curva de sobrevivência dos camundongos Balb/C e CBA, avaliou-se a evolução do hematócrito nos 4º, 9º, 15º e 21º dias para os camundongos Balb/C, e nos 4º e 9º dias para os camundongos CBA. O vigésimo primeiro e o nono dias foram escolhidos como limítrofes para avaliação do hematócrito para o Balb/C e para o CBA, respectivamente, pois até este dia ainda havia número de animais suficiente para comparação.

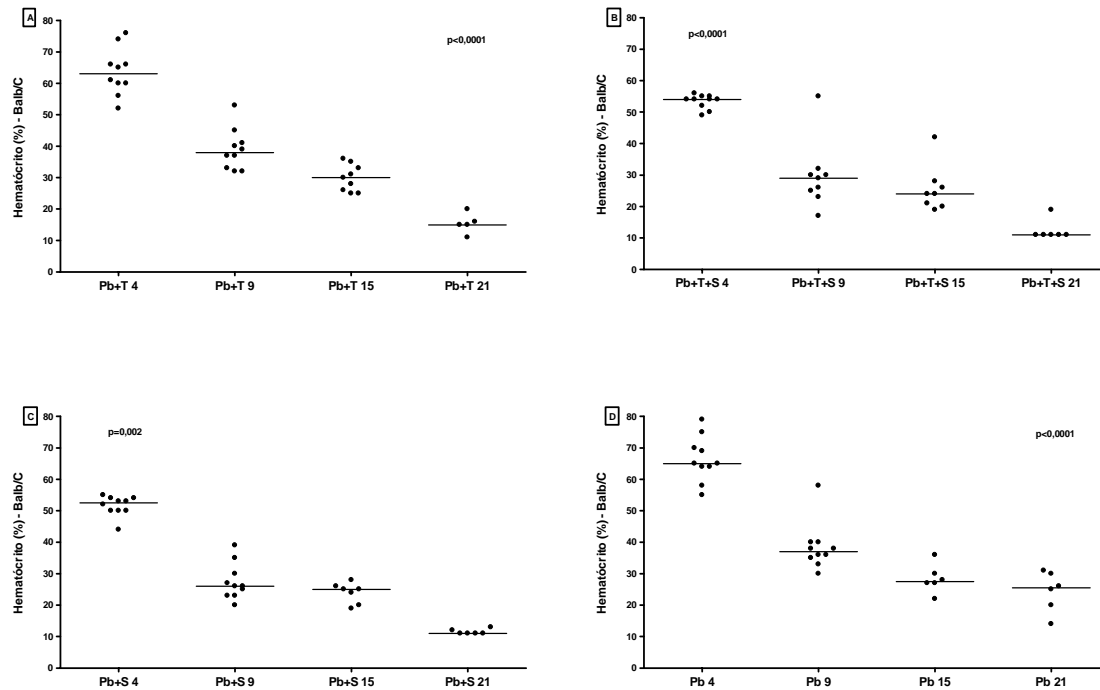
O objetivo desta mensuração foi avaliar a influência da talidomida, da sacarose e da combinação de ambas sobre a evolução do hematócrito na infecção malárica nestes modelos experimentais. Para tanto, 39 camundongos Balb/C infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foram divididos para os seguintes

tratamentos: talidomida (Pb+T; n=10), talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S, n=9), sacarose (Pb+S; n=10) ou água destilada (Pb; n=10). Para os camundongos CBA, 16 animais foram infectados, avaliando-se a evolução do hematócrito para os seguintes tratamentos: talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S; n=8) ou sacarose (Pb+S; n=8).

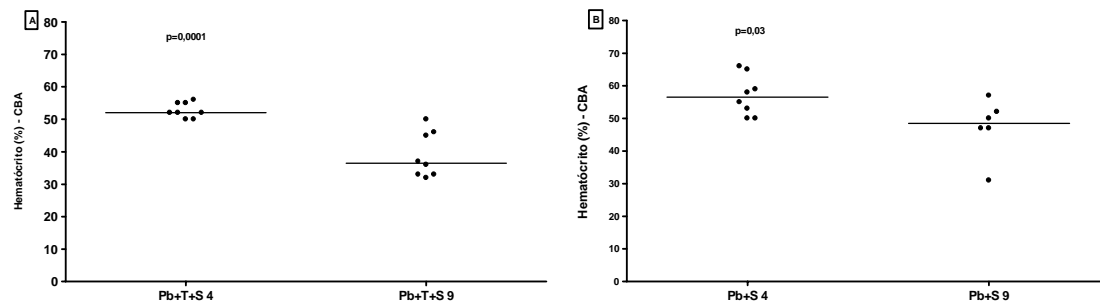
Houve diminuição significativa da mediana dos hematócritos dos animais de todos os grupos para dos camundongos Balb/C e CBA ( $p < 0,05$ , ANOVA ou Kruskal-Wallis, **figura 16**).

Nos camundongos Balb/C, o grupo Pb+T apresentou redução de 76,2% na mediana do hematócrito do quarto até o vigésimo primeiro dia de infecção (mediana do quarto dia: 63% e mediana do vigésimo primeiro dia: 15%) enquanto que os animais do grupo Pb+T+S apresentaram redução de 79,6% (mediana do quarto dia: 54%; mediana do vigésimo primeiro dia: 11%) ( $p < 0,0001$ , ANOVA, **figura 16A e 16B**). Os animais do grupo Pb+S apresentaram redução de 79% na mediana do hematócrito do quarto (52,5%) até o vigésimo primeiro dia de infecção (11%) ( $p = 0,002$ , ANOVA, **figura 16C**) enquanto que camundongos do grupo Pb apresentaram redução de 60,8% (mediana do 4° dia: 65% e mediana do 21° dia: 25,5%) ( $p < 0,0001$ , Kruskal-Wallis, **figura 16D**).

Nos camundongos CBA, o grupo Pb+T+S apresentou redução de 29,8% na mediana do hematócrito do quarto (52%) para o nono dia de infecção (36,5%) ( $p = 0,0001$ , teste *t*, **figura 17A**). O grupo Pb apresentou redução de 14,2% na mediana do hematócrito do quarto (56,5%) para nono dia de infecção (48,5%) ( $p = 0,03$ , Mann-Whitney, **figura 17B**).



**Figura 16.** Influência do tratamento com talidomida, com sacarose, com talidomida diluída em sacarose e com água destilada sobre o hematócrito de camundongos Balb/C infectados com *Plasmodium berghei* ANKA nos 4°, 9°, 15° e 21° dias de infecção. A) Hematócrito do grupo tratado com talidomida (Pb+T);  $p < 0,0001$ . B) Hematócrito do grupo tratado com talidomida em sacarose (Pb+T+S);  $p < 0,0001$ . C) Hematócrito do grupo tratado com sacarose (Pb+S);  $p = 0,002$ . D) Hematócrito do grupo tratado com água (Pb);  $p < 0,0001$ . Todas as análises foram realizadas pelo teste de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os dias para todos os tratamentos, exceto para o grupo Pb onde foi usado o teste de Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn.

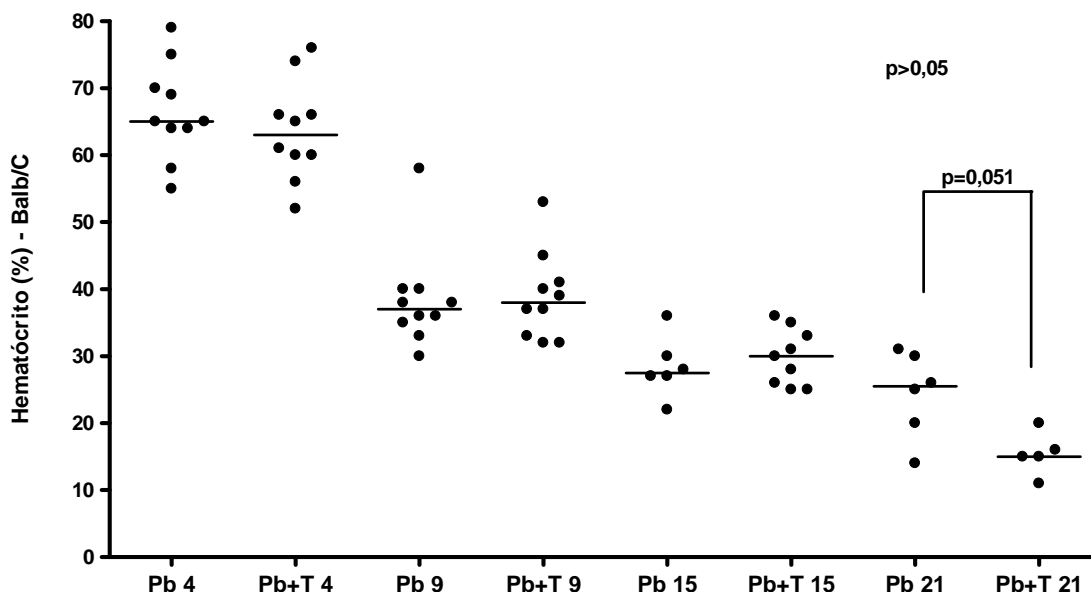


**Figura 17.** Influência do tratamento com talidomida em animais concomitantemente tratados com sacarose sobre o hematócrito de camundongos CBA infectados por *Plasmodium berghei* ANKA nos 4° e 9° dias de infecção. A) Hematócrito do grupo tratado com talidomida em sacarose (Pb+T+S);  $p = 0,0001$ , teste  $t$ . B) Hematócrito do grupo tratado com sacarose (Pb+S);  $p = 0,03$ , teste Mann-Whitney.

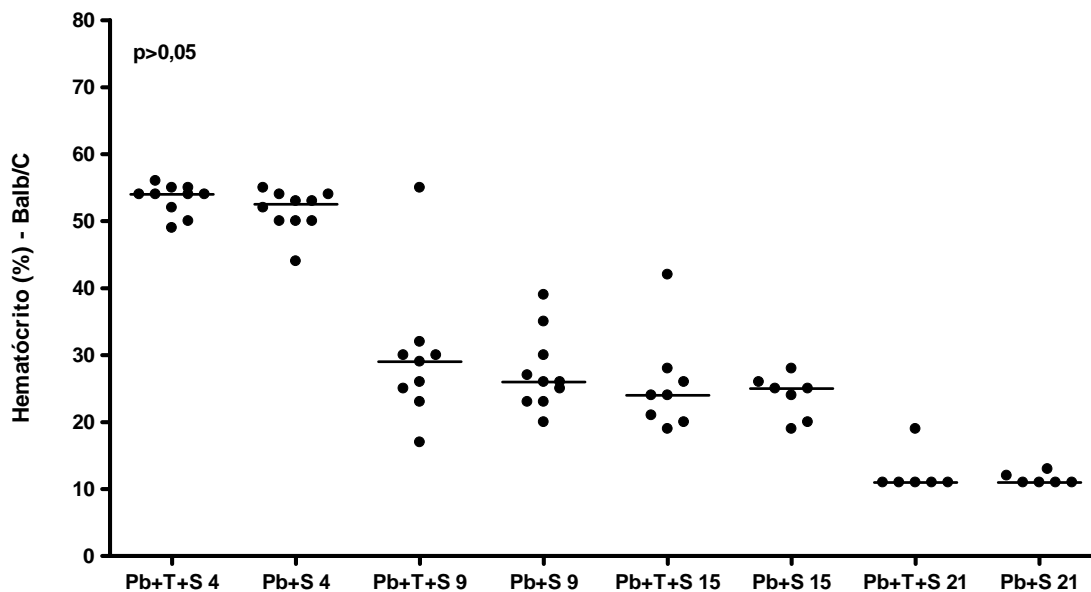
#### 4.3.1 Influência da talidomida sobre a evolução do hematócrito em camundongos Balb/C

Para verificar a influência da talidomida sobre a evolução do hematócrito nos animais maláricos foi avaliado o hematócrito dos animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados (Pb+T, n=10) ou não (Pb, n=10) com talidomida. Para verificar a influência da talidomida no hematócrito quando os animais infectados estavam recebendo concomitantemente sacarose foram comparados os grupos infectados e tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S, n=9) ou apenas com sacarose (Pb+S, n=10).

Não houve diferença estatística significativa entre as medianas dos hematócritos coletados nos quarto, nono, décimo quinto e vigésimo primeiro dias dos grupos Pb+T e Pb e dos grupos Pb+T+S e Pb+S ( $p > 0,05$ , teste *t* e Mann-Whitney, **figura 18 e 19**, respectivamente). Entretanto, no vigésimo primeiro dia a comparação entre as medianas dos hematócritos do grupo Pb+T e Pb mostrou maior redução na mediana no grupo tratado com talidomida (Pb+T) (mediana: 15% e 25,5%, respectivamente;  $p = 0,051$ , Mann-Whitney).



**Figura 18.** Análise comparativa entre os hematócritos dos 4º, 9º, 15º e 21º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos Balb/C tratados com talidomida (Pb+T) ou água destilada (Pb). A diminuição do hematócrito foi progressiva nos dois grupos, porém não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos nos diversos dias entre os grupos Pb+T e Pb, exceto para o vigésimo primeiro dia. As análises do 4º dia foram realizadas pelo teste *t* e dos demais dias pelo teste Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).



**Figura 19.** Análise comparativa entre os hematócritos dos 4º, 9º, 15º e 21º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos Balb/C tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S) ou somente com sacarose (Pb+S). A diminuição do hematócrito foi progressiva nos dois grupos, porém não houve diferença estatística significativa quando comparados os tratamentos. As análises do 4º dia foram realizadas pelo teste *t* e dos demais dias pelo teste Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).

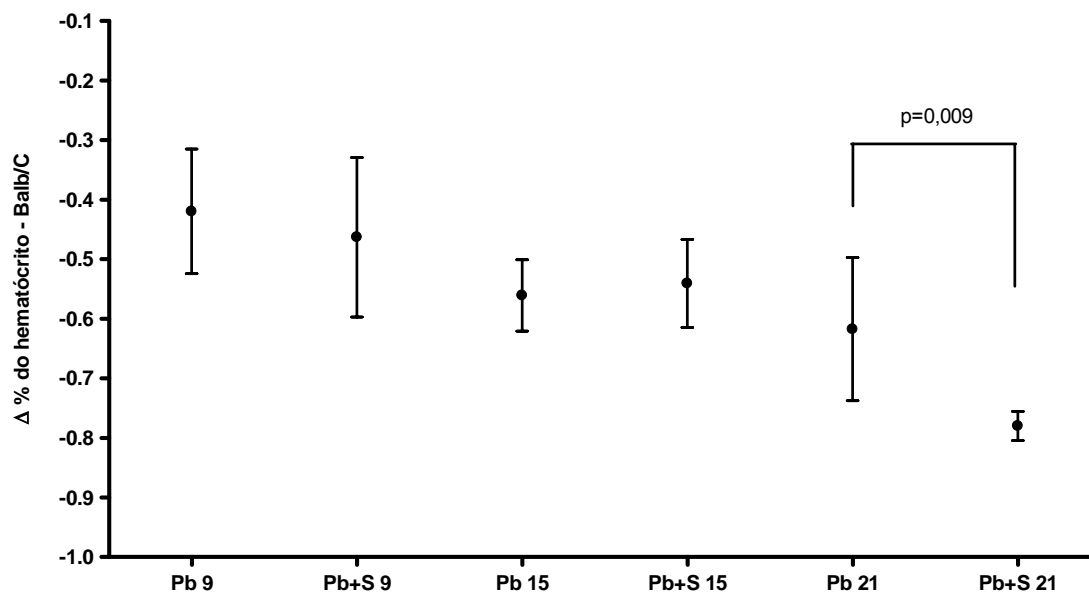


### 4.3.2 Influência da sacarose sobre a evolução do hematócrito em camundongos Balb/C

Para se avaliar a influência da sacarose sobre a evolução do hematócrito durante a infecção malárica em camundongos Balb/C, dois grupos foram infectados e tratados com sacarose (Pb+S, n=10) ou com água destilada (Pb, n=10). Ainda, para avaliar a influência da sacarose no tratamento com talidomida, dois grupos de camundongos Balb/C foram infectados e tratados com talidomida (Pb+T, n=10), sendo um deles tratado também com sacarose (Pb+T+S, n=9).

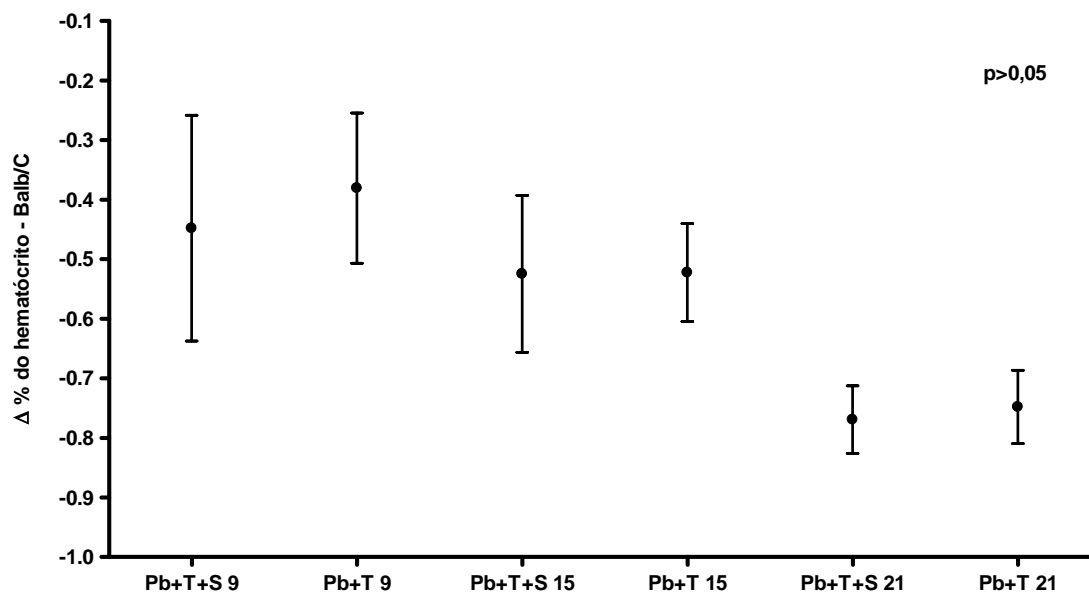
Como os grupos comparados apresentavam variação no hematócrito inicial, foi avaliada a variação percentual expressa pelo hematócrito final (Hf) menos o hematócrito inicial (Hi) dividido pelo hematócrito inicial ( $\Delta\%$ :  $(hf-hi)/hi$ ).

Não houve diferença estatística significativa no hematócrito do nono e décimo quinto dias entre o grupo tratado com sacarose (Pb+S) e o grupo tratado com água destilada (Pb) ( $p>0,05$ , Mann-Whitney) (média do  $\Delta\%$  do 9° dia:  $-0,46\pm 0,13\%$  e  $-0,42\pm 0,11\%$ ; média do  $\Delta\%$  do 15° dia:  $-0,54\pm 0,07\%$  e  $-0,56\pm 0,06\%$ , respectivamente). Porém, no vigésimo primeiro dia o grupo Pb+S apresentou maior redução na média do hematócrito com relação ao grupo Pb (média do  $\Delta\%$ :  $-0,78\pm 0,02\%$  e  $-0,62\pm 0,12\%$ , respectivamente,  $p=0,009$ , Mann-Whitney, **figura 20**).



**Figura 20.** Variação percentual dos hematócritos dos 9º, 15º e 21º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos Balb/C tratados com sacarose (Pb+S) ou não (Pb). A diminuição do hematócrito foi progressiva nos dois grupos, porém não houve diferença estatística significativa quando comparados os tratamentos ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney), exceto no 21º dia onde o grupo Pb+S apresentou maior redução na média do hematócrito (média do  $\Delta\%$ :  $-0,78\% \pm 0,02\%$ ) em relação ao grupo Pb (média do  $\Delta\%$ :  $-0,61\% \pm 0,12\%$ ) ( $p = 0,009$ , Mann-Whitney).

Quando a comparação foi realizada entre os grupos tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S) ou apenas com talidomida em água (Pb+T), verificamos que não houve diferença estatística significativa na média do  $\Delta\%$  do hematócrito entre os dois grupos ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney e teste t, **figura 21**).



**Figura 21.** Variação percentual dos hematócritos dos 9º, 15º e 21º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos Balb/C tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S) ou com talidomida em água destilada (Pb+T). A diminuição do hematócrito foi progressiva nos dois grupos, porém não houve diferença estatística significativa quando comparados os tratamentos Pb+T+S x Pb+T ( $p>0,05$ , Mann-Whitney e teste  $t$ ).

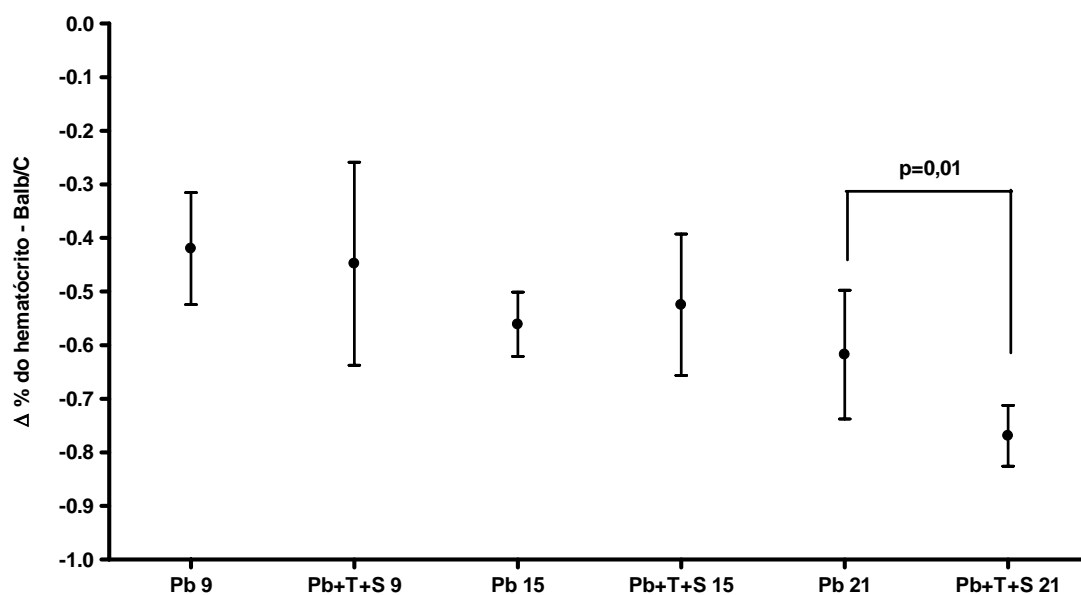
#### 4.3.3 Influência da talidomida diluída em sacarose sobre a evolução do hematócrito em camundongos Balb/C

Para verificar a influência da talidomida diluída em sacarose na evolução do hematócrito em camundongos Balb/C infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, os animais foram tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S, n=9) ou água destilada (Pb, n=10).

Como os grupos comparados apresentavam variação no hematócrito inicial, avaliou-se a variação percentual do hematócrito ( $\Delta\%=(hf-hi)/hi$ ).

Houve diminuição progressiva do hematócrito em ambos os grupos, porém não houve diferença estatística significativa entre os grupos Pb+T+S e Pb até o

décimo quinto dia (média do  $\Delta\%$  do 9° dia:  $-0,45\% \pm 0,19\%$  e  $-0,42\% \pm 0,10\%$ ; média do  $\Delta\%$  do 15° dia:  $-0,52\% \pm 0,13\%$  e  $-0,56\% \pm 0,06\%$ , respectivamente,  $p > 0,05$ , Mann-Whitney). Entretanto, no vigésimo primeiro dia o grupo Pb+T+S apresentou maior redução do hematócrito em relação ao grupo Pb (média do  $\Delta\%$ :  $-0,77\% \pm 0,06\%$  e  $-0,62\% \pm 0,12\%$ , respectivamente,  $p = 0,01$ , Mann-Whitney, **figura 22**).



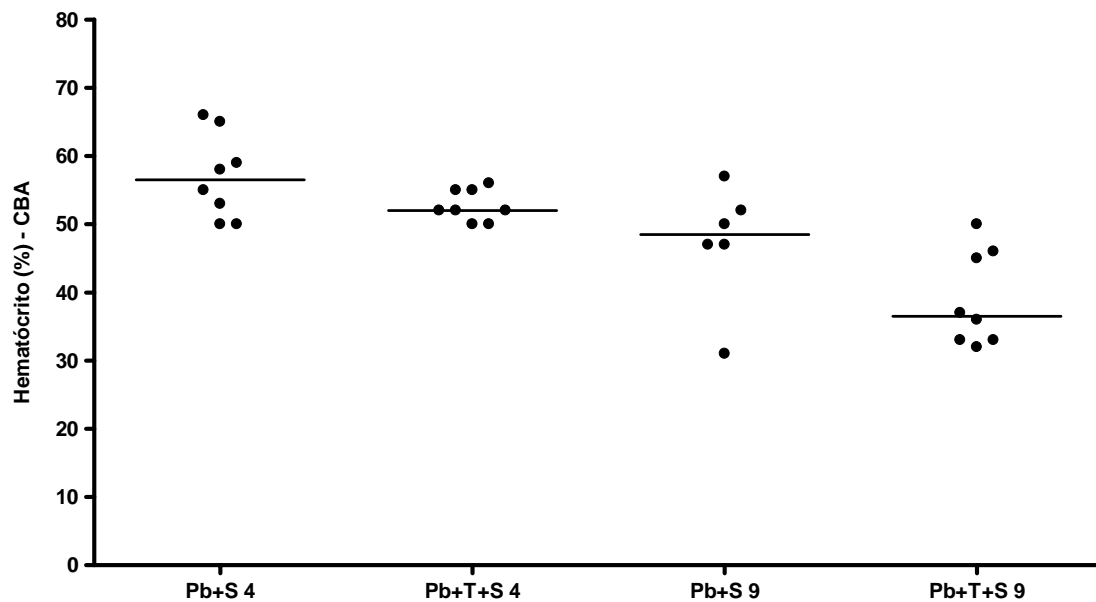
**Figura 22.** Variação percentual do hematócrito nos 9º, 15º e 21º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos Balb/C tratados talidomida em sacarose (Pb+T+S) ou água destilada (Pb). A diminuição do hematócrito foi progressiva nos dois grupos, porém não houve diferença estatística significativa quando comparados os tratamentos Pb+T+S x Pb nos 9º e 15º dias ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney e teste  $t$ ), exceto no 21º dia ( $p = 0,01$ , Mann-Whitney).

#### 4.3.4 Influência da talidomida sobre a evolução do hematócrito em camundongos CBA

Para verificar a influência da talidomida diluída em sacarose sobre a evolução do hematócrito nos camundongos CBA, foram comparados os hematócritos coletados nos quarto e nono dias nos grupos infectados com

*Plasmodium berghei* ANKA e tratados com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S, n=8) ou apenas com sacarose (Pb+S, n=8).

Não houve diferença estatística significativa entre as medianas dos hematócritos do grupo Pb+T+S e do grupo Pb+S, nem no quarto nem no nono dia ( $p=0,09$ , teste  $t$ ,  $p=0,08$ , Mann-Whitney, respectivamente, **figura 23**).



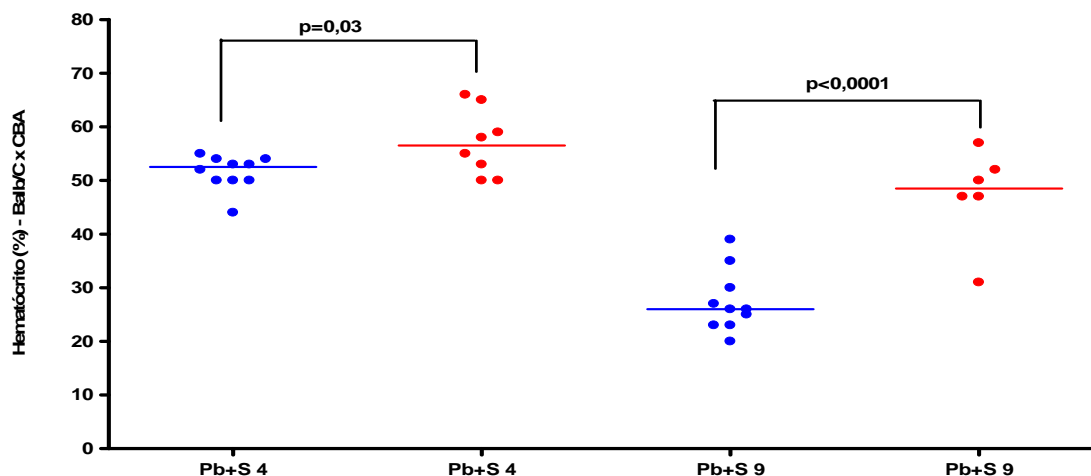
**Figura 23.** Análise comparativa entre os hematócritos do 4º e 9º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos CBA tratados com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S) ou somente com sacarose (Pb+S). A diminuição do hematócrito foi progressiva nos dois grupos, porém não houve diferença estatística significativa quando comparados os tratamentos. As análises do 4º dia foram realizadas pelo teste  $t$  e do 9º dia pelo teste Mann-Whitney ( $p>0,05$ ).

#### 4.3.5 Comparação da evolução do hematócrito nos camundongos Balb/C e CBA

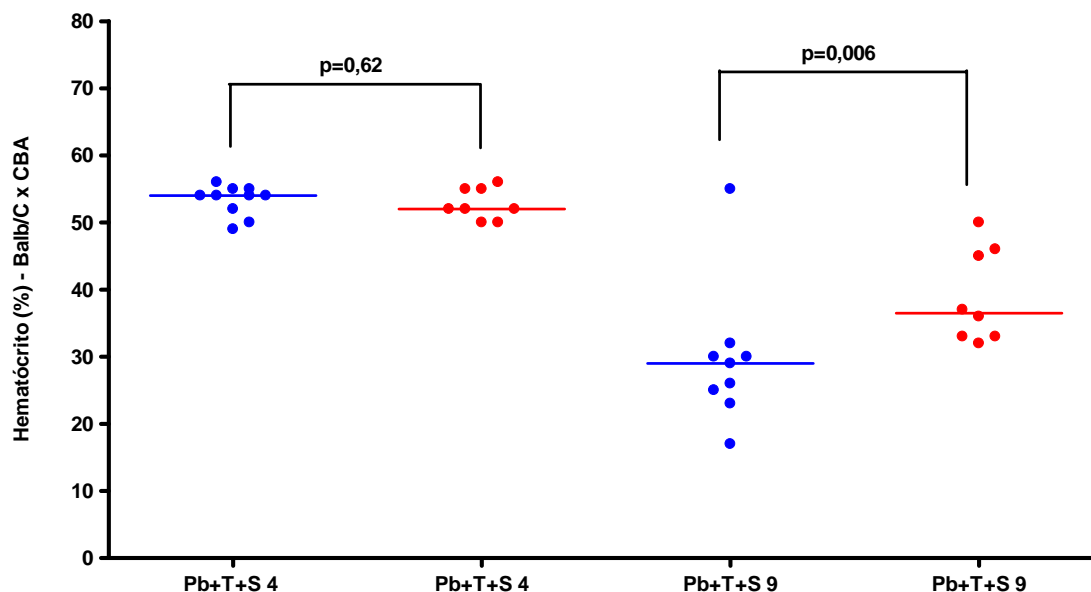
As medianas dos hematócritos dos camundongos Balb/C e CBA infectados e tratados com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S, n=9 e 8, respectivamente) ou somente com sacarose (Pb+S, n=10 e 8, respectivamente)

também foram comparadas entre si para avaliar a influência da sacarose e da talidomida em sacarose na evolução do hematócrito nestes dois modelos experimentais.

Houve diferença entre os hematócritos dos dois modelos estudados no quarto ( $p=0,03$ , teste  $t$ ) e no nono dia da infecção ( $p<0,0001$ , teste  $t$ ), sendo que a redução na mediana do hematócrito foi maior nos camundongos Balb/C (50,5%) do que nos camundongos CBA (14,2%) (mediana no quarto dia: 52,5% e 56,5%; mediana no nono dia: 26% e 48,5% respectivamente) (**figura 24**). Porém, para os camundongos Balb/C e CBA tratados com talidomida em sacarose, no quarto dia, não houve diferença entre as medianas do hematócrito (mediana: 54% e 52%, respectivamente,  $p=0,62$ , teste  $t$ ). Entretanto, no nono dia de infecção os camundongos Balb/C apresentaram maior redução do hematócrito (46,3%) do que os camundongos CBA (29,8%) (mediana: 29% e 36,5%, respectivamente,  $p=0,006$ , Mann-Whitney, **figura 25**).



**Figura 24.** Análise comparativa entre os hematócritos do 4º e 9º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos Balb/C (●) e CBA (●) tratados com sacarose (Pb+S, n=10 e 8, respectivamente). No quarto e no nono dia houve influência do tratamento com sacarose nos camundongos Balb/C e CBA ( $p<0,05$ , teste  $t$ ). Os camundongos Balb/C apresentaram maior redução da mediana do hematócrito que os camundongos CBA.



**Figura 25.** Análise comparativa entre os hematócritos do 4º e 9º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos Balb/C (●) e CBA (●) tratados com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S, n=10 e 8, respectivamente). No quarto dia não houve influência do tratamento com talidomida em sacarose entre os camundongos Balb/C e CBA ( $p>0,05$ , teste *t*). Porém, no nono dia de infecção os animais do modelo Balb/C apresentavam hematócrito significativamente menor do que os animais do modelo CBA ( $p=0,006$ , Mann-Whitney).

A maioria dos camundongos Balb/C dos grupos Pb+T+S e Pb+S morreu no 21º dia com a mediana do hematócrito de 11%. A maioria dos camundongos CBA morreu no 9º dia com a mediana do hematócrito de 48,5% para o grupo Pb+S e no 15º dia com mediana do hematócrito de 25% para o grupo Pb+T+S. Os camundongos CBA que sobreviveram até o 21º dia apresentavam mediana do hematócrito em 21% e 23,5%, respectivamente.

#### **4.4 Evolução da parasitemia nos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA**

Para avaliar a influência da talidomida, da sacarose e da combinação de ambas sobre a evolução da parasitemia nos camundongos Balb/C durante a infecção malárica, 39 animais foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e separados em três grupos: grupo Pb+T, no qual 10 animais foram infectados com *P. berghei* e tratados com talidomida; grupo Pb+T+S, no qual 9 animais foram infectados com *P. berghei* e tratados com talidomida em solução de sacarose; grupo Pb+S, no qual 10 animais infectados com *P. berghei* receberam apenas sacarose; e grupo Pb, no qual 10 animais infectados com *P. berghei* foram tratados com água destilada.

Dos camundongos CBA, 16 animais foram infectados pelo *Plasmodium berghei* Anka, sendo que 8 animais foram tratados com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S) e 8 animais foram tratados apenas com sacarose (Pb+S).

A parasitemia foi avaliada no sangue coletado da ponta da cauda nos 4°, 9°, 15° e 21° dias para os camundongos Balb/C, e nos 4° e 9° dias para os camundongos CBA. O vigésimo primeiro e o nono dias foram escolhidos como limítrofes para avaliação da parasitemia para o Balb/C e para o CBA, respectivamente, pois ainda havia número de animais para permitir a comparação entre os grupos.

Houve aumento da parasitemia em todos os grupos entre o quarto e o vigésimo primeiro dia de infecção nos camundongos Balb/C ( $p < 0,0001$ , Kruskal-



Wallis) e entre o quarto e o nono dia de infecção para os camundongos CBA ( $p < 0,01$ , Mann-Whitney).

#### **4.4.1 Influência da talidomida na evolução da parasitemia dos camundongos Balb/C**

Quatro grupos de camundongos Balb/C foram infectados com o objetivo de avaliar a influência da talidomida e da talidomida em sacarose na evolução da parasitemia. Comparou-se a evolução da parasitemia no grupo tratado com talidomida (Pb+T,  $n=10$ ) em relação ao grupo tratado apenas com água (Pb,  $n=10$ ), e do grupo tratado com talidomida em sacarose (Pb+T+S,  $n=9$ ) em relação ao grupo tratado apenas com sacarose (Pb+S,  $n=10$ ).

Não houve diferença na evolução da parasitemia entre os grupos tratados com talidomida ou água ( $p > 0,05$ , teste  $t$  e Mann-Whitney, **figura 26**). Porém houve uma tendência dos animais do grupo tratado apenas com água apresentarem parasitemia maior no quarto dia de infecção ( $p=0,06$ , teste  $t$ ).

Para as animais tratados com talidomida em sacarose, verificamos que a talidomida retardou o aumento da parasitemia no vigésimo primeiro dia em relação ao grupo tratado apenas com sacarose ( $p=0,02$ , Mann-Whitney, **figura 27**). A parasitemia do grupo Pb+S foi 11,2% maior que a parasitemia do grupo Pb+T+S neste dia.

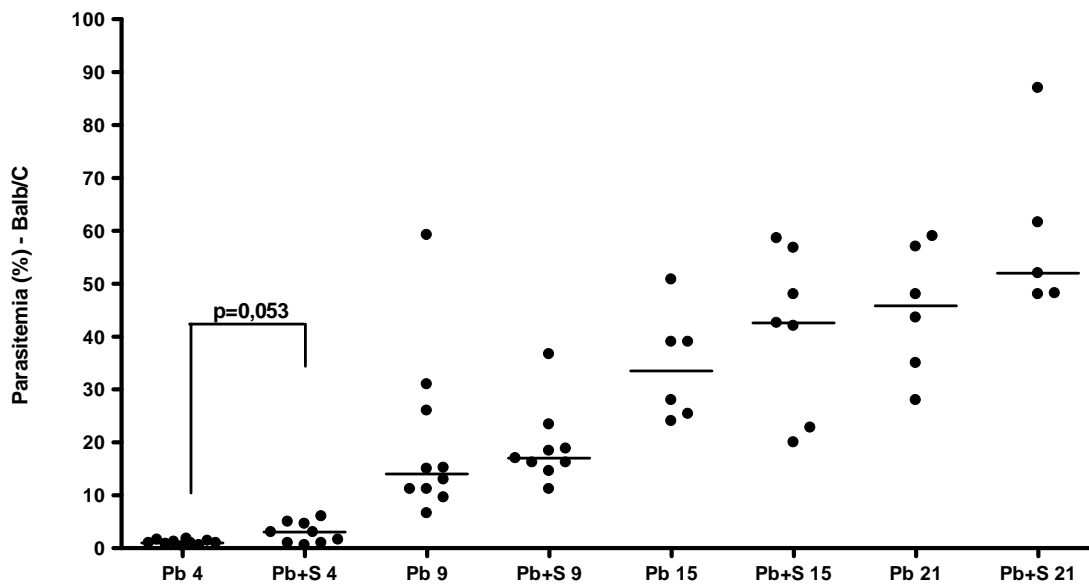


#### 4.4.2 Influência da sacarose na evolução da parasitemia dos camundongos Balb/C

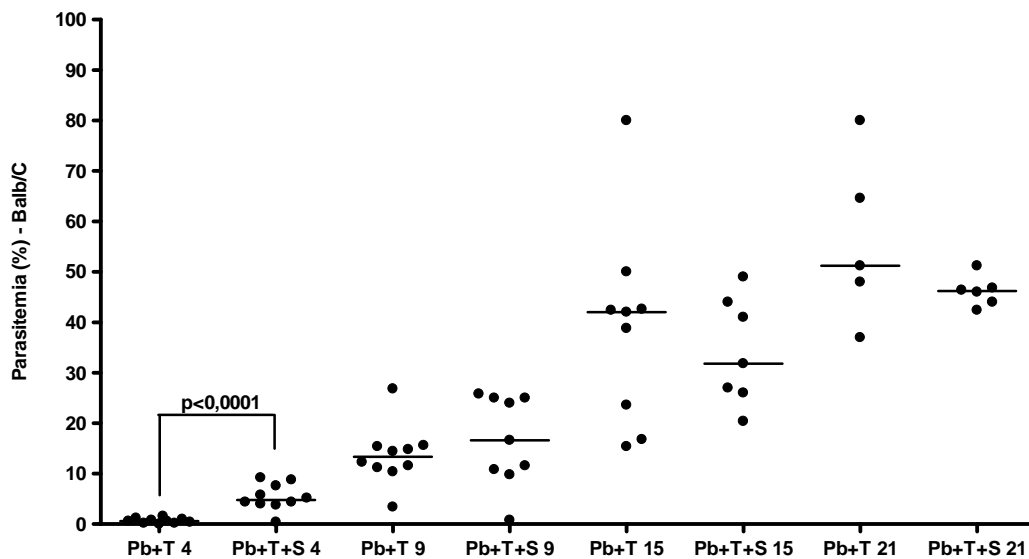
Para avaliar a influência da sacarose na evolução da parasitemia dos camundongos Balb/C durante a infecção malárica, dois grupos foram infectados e tratados da seguinte maneira: em um deles foi administrada apenas sacarose (Pb+S, n=10) e no outro foi administrada apenas água destilada (Pb, n=10). Para avaliar a influência da sacarose na evolução da parasitemia dos animais tratados com talidomida, um grupo infectado foi tratado com talidomida (Pb+T, n=10) e o outro com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S, n=9).

Embora no limite da significância estatística, os animais tratados apenas com sacarose apresentaram maior parasitemia no quarto dia de infecção em relação aos animais não tratados ( $p=0,053$ , Mann-Whitney, **figura 28**), não apresentando diferença estatística nos outros dias. O grupo tratado com sacarose apresentou mediana da variação percentual da parasitemia de 3% enquanto que o grupo não tratado apresentou a mediana de 1% no quarto dia de infecção.

Quando a sacarose foi associada à talidomida também houve aumento mais precoce da parasitemia em relação aos animais tratados apenas com talidomida, no quarto dia de infecção ( $p<0,0001$ , teste  $t$ , **figura 29**). O grupo tratado com talidomida em sacarose apresentou mediana da variação percentual da parasitemia de 4,8% enquanto que o grupo tratado apenas com talidomida apresentou mediana de 0,6% no quarto dia de infecção.



**Figura 28.** Influência da sacarose sobre a parasitemia (%) nos 4º, 9º, 15º e 21º dias da infecção dos camundongos Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA, tratados com sacarose (Pb+S) ou não (Pb). Os animais tratados com sacarose apresentaram maior parasitemia no quarto dia ( $p=0,053$ , Mann Whitney). Não houve diferença estatística entre a variação percentual da parasitemia nos outros dias ( $p>0,05$ ). O teste utilizado foi o de Mann-Whitney.

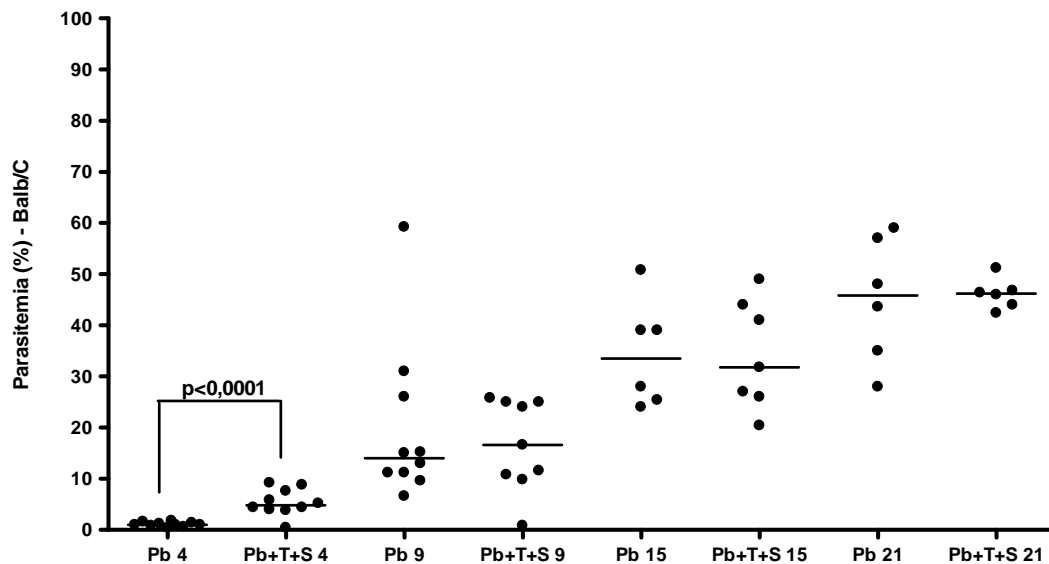


**Figura 29.** Influência da sacarose sobre a parasitemia (%) nos 4º, 9º, 15º e 21º dias da infecção dos camundongos Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA, tratados com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S) ou apenas com talidomida (Pb+T). A adição de sacarose aos animais previamente tratados com talidomida aumentou a parasitemia no quarto dia ( $p<0,0001$ , teste *t*). Não houve diferença estatística da parasitemia entre os dois grupos nos outros dias ( $p>0,05$ ). Os testes utilizados foram o teste *t* para o nono e décimo quinto dia e o teste de Mann-Whitney para o vigésimo dia.

#### 4.4.3 Influência da talidomida diluída em sacarose na evolução da parasitemia dos camundongos Balb/C

Para avaliar a influência da talidomida associada à sacarose na evolução da parasitemia dos camundongos Balb/C na infecção malárica, dois grupos foram infectados, sendo um tratado com talidomida em sacarose (Pb+T+S, n=9) enquanto que o outro grupo recebeu apenas água destilada (Pb, n=10).

A associação da talidomida com a sacarose causou aumento mais precoce da parasitemia quando comparado aos animais não tratados, no quarto dia de infecção ( $p < 0,0001$ , teste  $t$ ). O grupo Pb+T+S apresentou mediana de 4,8% enquanto que a mediana do grupo Pb foi de 1% neste dia. Entretanto, não houve diferença estatística entre os dois grupos para os demais dias na evolução da parasitemia.

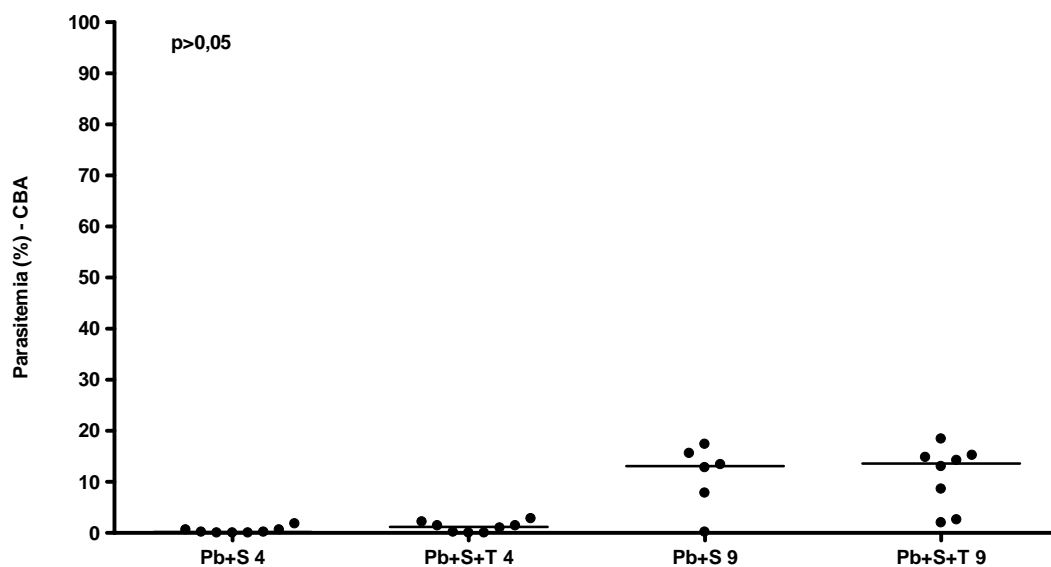


**Figura 30.** Influência da talidomida diluída em sacarose sobre a parasitemia (%) nos 4º, 9º, 15º e 21º dias da infecção dos camundongos Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA, tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S) ou com água destilada (Pb). Os animais tratados com talidomida em sacarose apresentaram aumento na parasitemia no quarto dia de infecção ( $p < 0,0001$ , teste  $t$ ). Não houve diferença estatística da parasitemia entre os dois grupos nos outros dias ( $p > 0,05$ ). O teste utilizado foi o de Mann-Whitney.

#### 4.4.4 Influência da talidomida na evolução da parasitemia nos camundongos CBA

Para avaliar a influência da talidomida na evolução da parasitemia dos camundongos CBA na infecção malárica, dois grupos foram infectados, sendo um tratado com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S, n=8) enquanto que o outro grupo recebeu apenas sacarose (Pb+S, n=8).

Não houve diferença estatística na evolução da parasitemia quando comparamos os tratamentos com talidomida em sacarose e apenas sacarose nos quarto e nono dias da infecção ( $p > 0,05$ , teste t, **figura 31**).

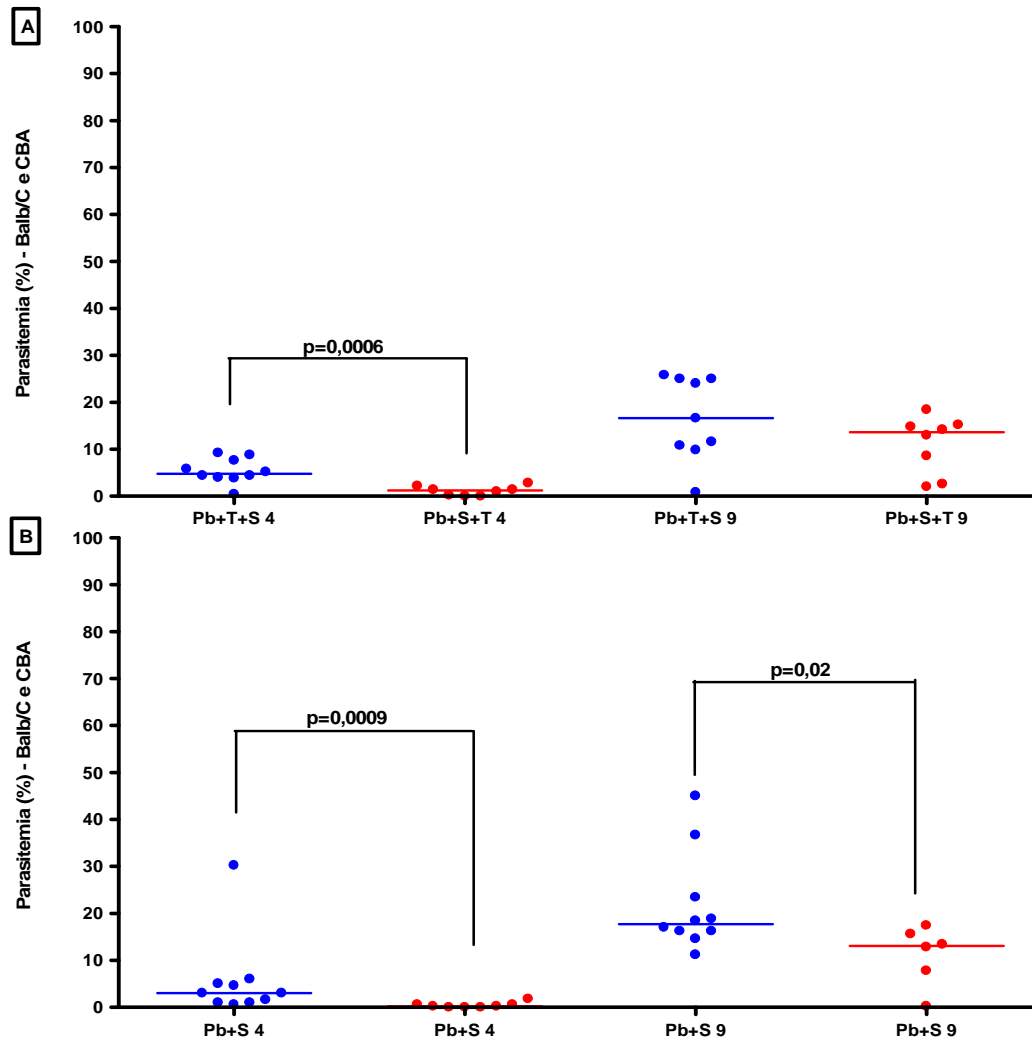


**Figura 31.** Influência da talidomida sobre a parasitemia (%) nos 4º e 9º dias de infecção dos camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA, tratados com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S) ou apenas com sacarose (Pb+S). Não houve diferença estatística da parasitemia entre os dois grupos nos quarto e nono dias ( $p > 0,05$ ). O teste utilizado foi o teste *t*.

#### 4.4.5 Comparação da influência da talidomida na evolução da parasitemia entre camundongos Balb/C e CBA

Os grupos de camundongos Balb/C e CBA infectados e tratados com talidomida em sacarose (Pb+T+S, n=9 e 8, respectivamente) ou somente sacarose (Pb+S, n=10 e 10, respectivamente) também foram comparados entre si.

O aumento da parasitemia foi mais precoce para os camundongos Balb/C tratados com talidomida em sacarose, sendo que a parasitemia destes camundongos no quarto dia da infecção foi de 4,8%, enquanto os camundongos CBA estavam com a parasitemia de 1% neste dia, para o mesmo tratamento ( $p=0,0006$ , teste *t*, **figura 32A**). Contudo, os camundongos Balb/C tratados apenas com sacarose apresentaram maior parasitemia no quarto (3%) e no nono dia (17%) em relação aos camundongos CBA (0,2% e 13,1%, respectivamente) ( $p=0,0009$  no quarto dia da infecção, Mann-Whitney e  $p=0,02$  no nono dia de infecção, Mann-Whitney, **figura 32B**).



**Figura 32.** Análise comparativa da influência da talidomida sobre a parasitemia (%) nos 4<sup>o</sup> e 9<sup>o</sup> dias de infecção entre os camundongos Balb/C (●) e CBA (●) infectados com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: A) Animais tratados com talidomida diluída em sacarose (Pb+T+S). Os camundongos Balb/C apresentaram maior parasitemia que os camundongos CBA no quarto dia de infecção. B) Animais tratados apenas com sacarose (Pb+S). Os camundongos Balb/C apresentaram maior parasitemia que os camundongos CBA nos quarto e nono dias de infecção. Os valores significantes de p estão descritos nos gráficos. Os testes utilizados foram o teste *t* para os grupos tratados com talidomida em sacarose e o Mann-Whitney para os grupos tratados apenas com sacarose.

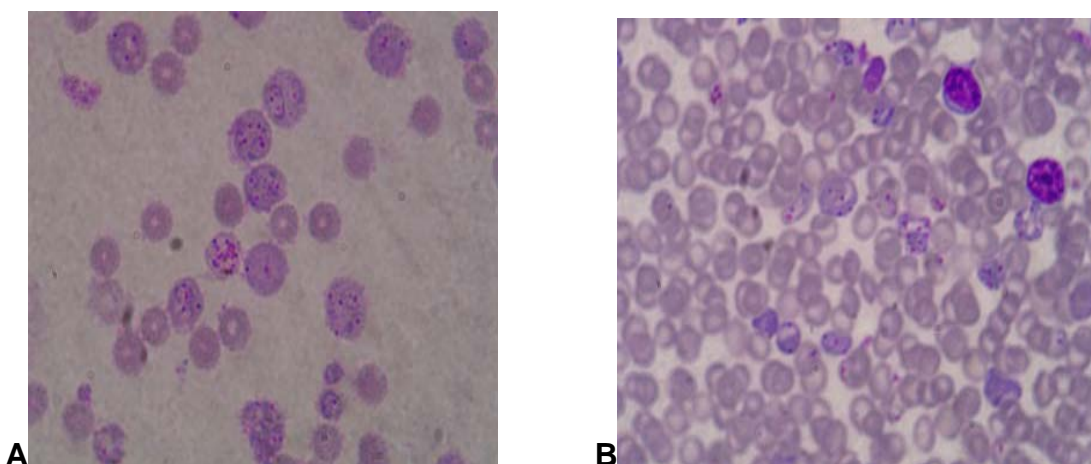
A parasitemia no décimo dia de infecção para os camundongos CBA (Pb+S), quando a maioria deles já havia morrido, era de 13,1%, enquanto que a dos camundongos Balb/C (Pb+S) era de 17%. Entretanto, no vigésimo primeiro



dia quando a maioria dos camundongos Balb/C já tinham morrido, a parasitemia destes animais era de 52%, cerca de 4 vezes maior do que a parasitemia com a qual camundongos CBA morreram. Porém, em 25% dos camundongos CBA que morreram tardiamente, no vigésimo dia de infecção, a mediana da parasitemia era de 28%.

#### 4.4.6 Aspectos morfológicos da parasitemia

Os aspectos morfológicos da parasitemia dos animais Balb/C e CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA no dia da morte espontânea encontram-se ilustrados na **figura 33**. Observamos parasitemia alta nos camundongos Balb/C (52%) e parasitemia baixa (13,1%) nos camundongos CBA. O tratamento com talidomida não modificou estes aspectos.



**Figura 33.** Parasitemia dos camundongos não susceptíveis e susceptíveis à malária cerebral, infectados com  $10^6$  eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA no dia da morte. A) Camundongo Balb/C no 21° dia de infecção. B) Camundongos CBA no 9° dia de infecção. Aumento de 1000x (Panótico).

#### **4.5 Influência da talidomida sobre a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA**

A influência da talidomida sobre a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo *P. berghei* ANKA foi avaliada pelos parâmetros: índice fagocitário (IF), média de leveduras ingeridas/aderidas por macrófago (M) e proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (MØ%). A avaliação da capacidade fagocitária foi realizada utilizando uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizada ou não com soro fresco murino ou na presença de soro fetal bovino inativado (SFB).

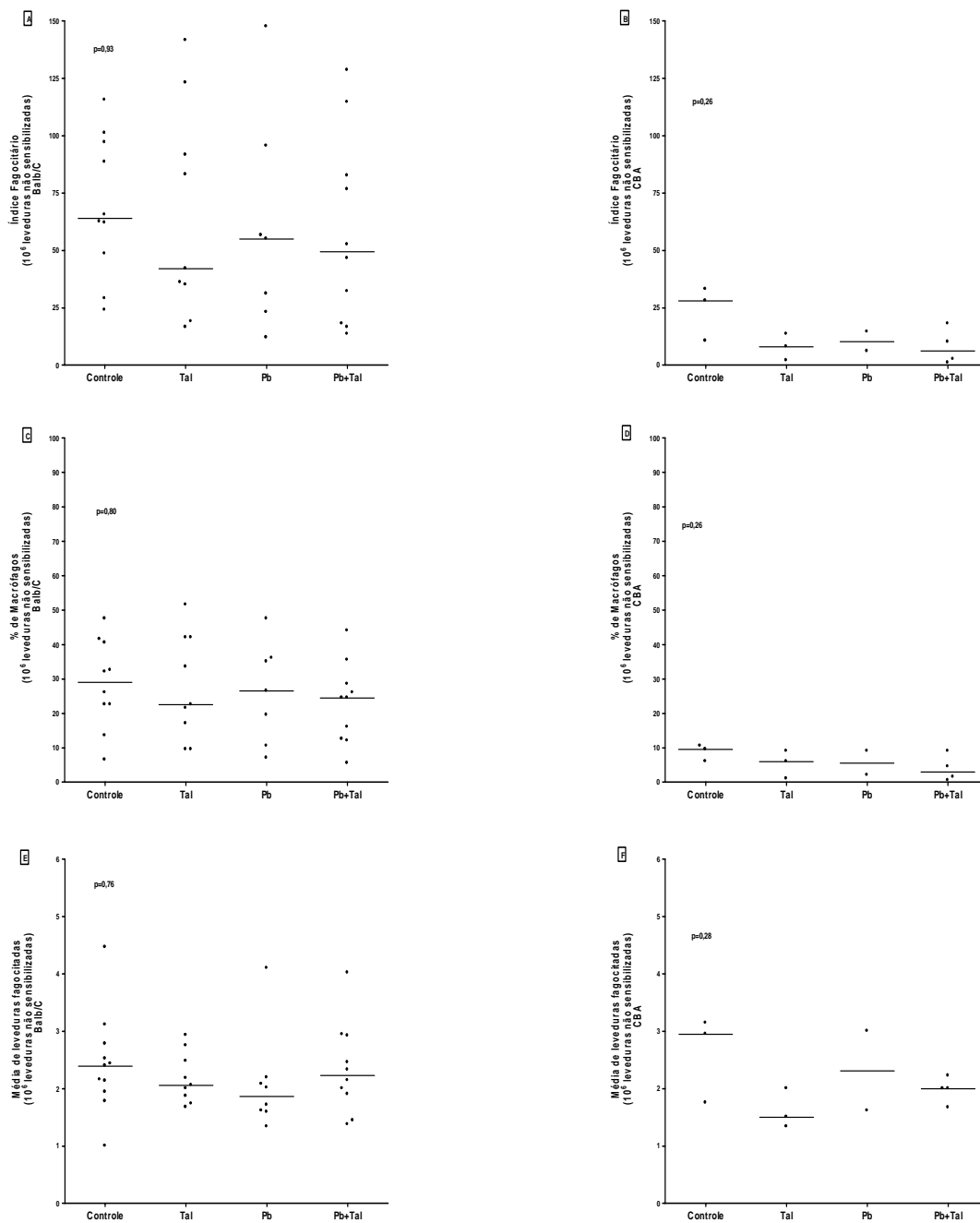
A capacidade fagocitária foi avaliada por meio da fagocitose por receptores para o sistema do complemento e para a porção Fc da imunoglobulina e pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (rPMP). O soro fresco de camundongo é rico em opsoninas, principalmente, as proteínas do sistema complemento, e por esta razão, foi utilizado para sensibilizar as leveduras e avaliar a fagocitose por destes receptores. Para avaliar a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, que reconhecem moléculas como manose e glucana presentes na superfície dos patógenos, realizamos o teste de fagocitose das leveduras não sensibilizadas na presença de soro fetal bovino inativado.

#### 4.5.1 Fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos

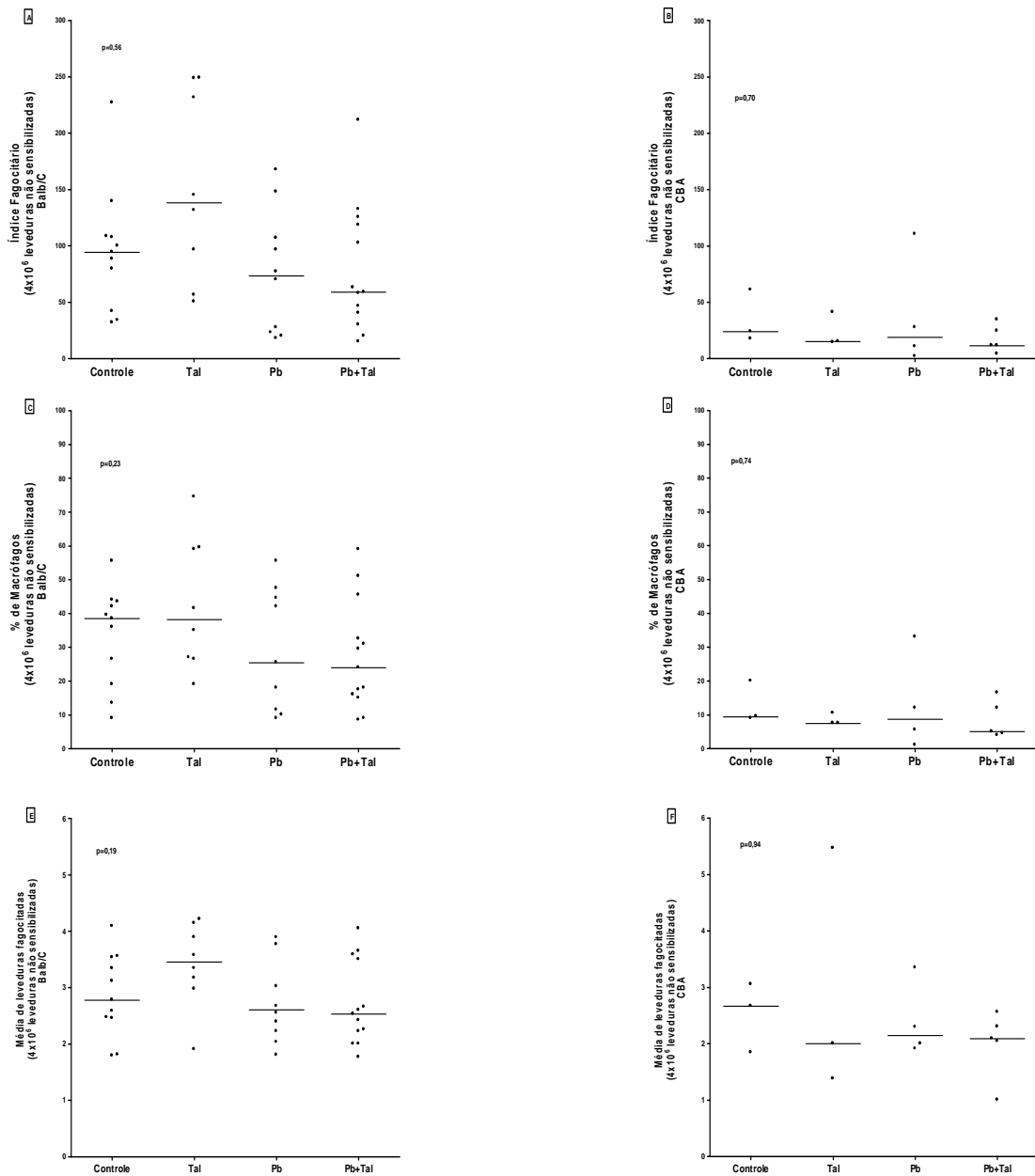
A avaliação da capacidade de ingerir leveduras pelos receptores para padrões de reconhecimento foi realizada utilizando  $10^6$  ou  $4 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas por escavação.

Não houve diferença estatística quanto às medianas dos índices fagocitários, envolvimento de macrófagos na fagocitose e quantidade de partículas ingeridas/aderidas pelos macrófagos dos camundongos Balb/C e dos camundongos CBA nos quatro grupos estudados, para as proporções de  $10^6$  e  $4 \times 10^6$  de leveduras não sensibilizadas ( $p > 0,05$ , ANOVA e Kruskal-Wallis, respectivamente, **figuras 34 e 35**).

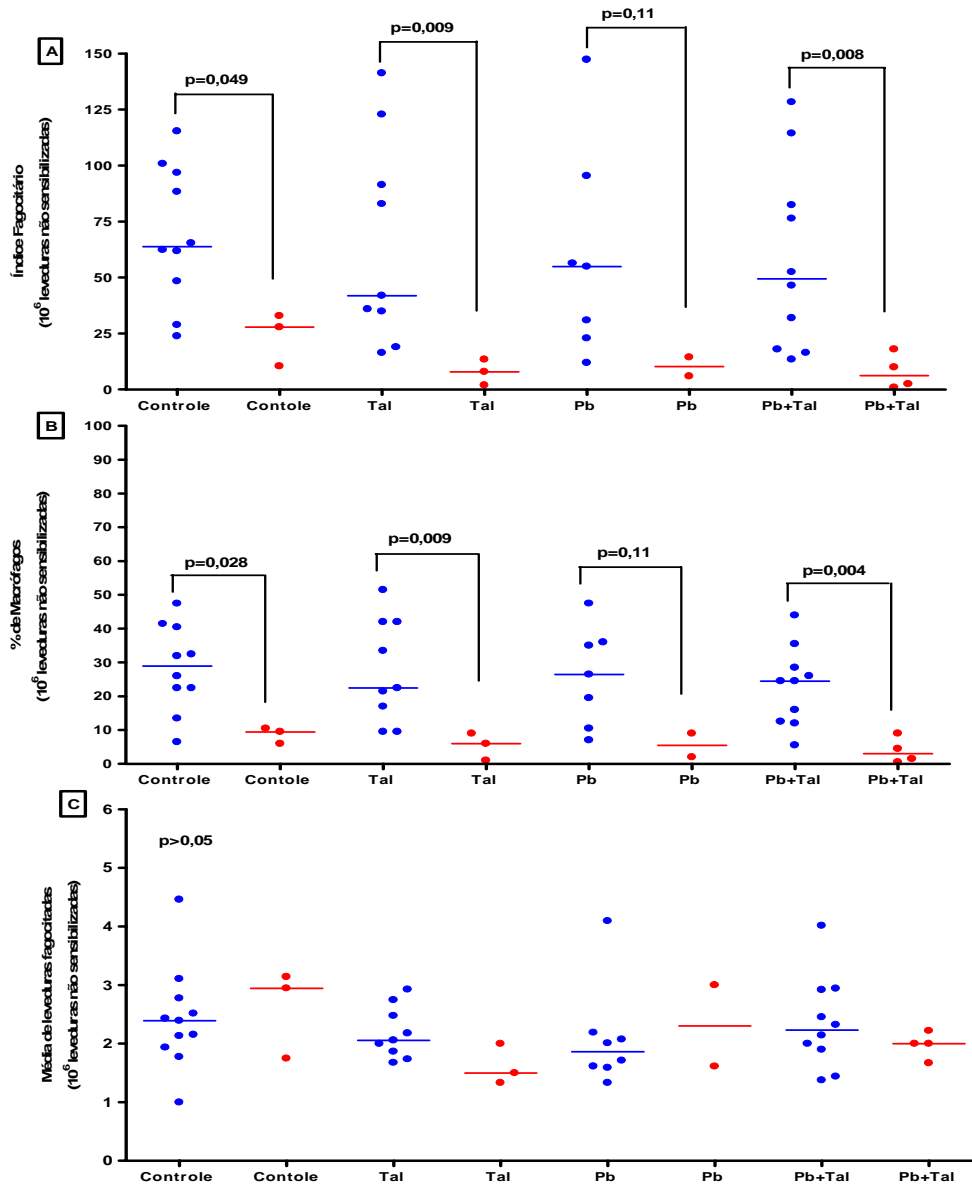
Comparando-se a capacidade fagocitária entre os dois modelos de camundongos verificamos que as medianas dos índices fagocitários dos camundongos Balb/C foram mais elevadas do que a dos animais do grupo CBA, para as duas proporções de leveduras estudadas ( $10^6$  ou  $4 \times 10^6$ ), ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney) para todos os grupos, exceto para os animais infectados não tratados (Pb) (**figuras 36A e 37A**). O aumento no índice fagocitário apresentado pelos macrófagos dos camundongos Balb/C foi devido ao maior envolvimento de macrófagos na fagocitose (**figuras 36B e 37B**), pois a quantidade de leveduras ingeridas manteve-se inalterada ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney, **figuras 36C e 37C**).



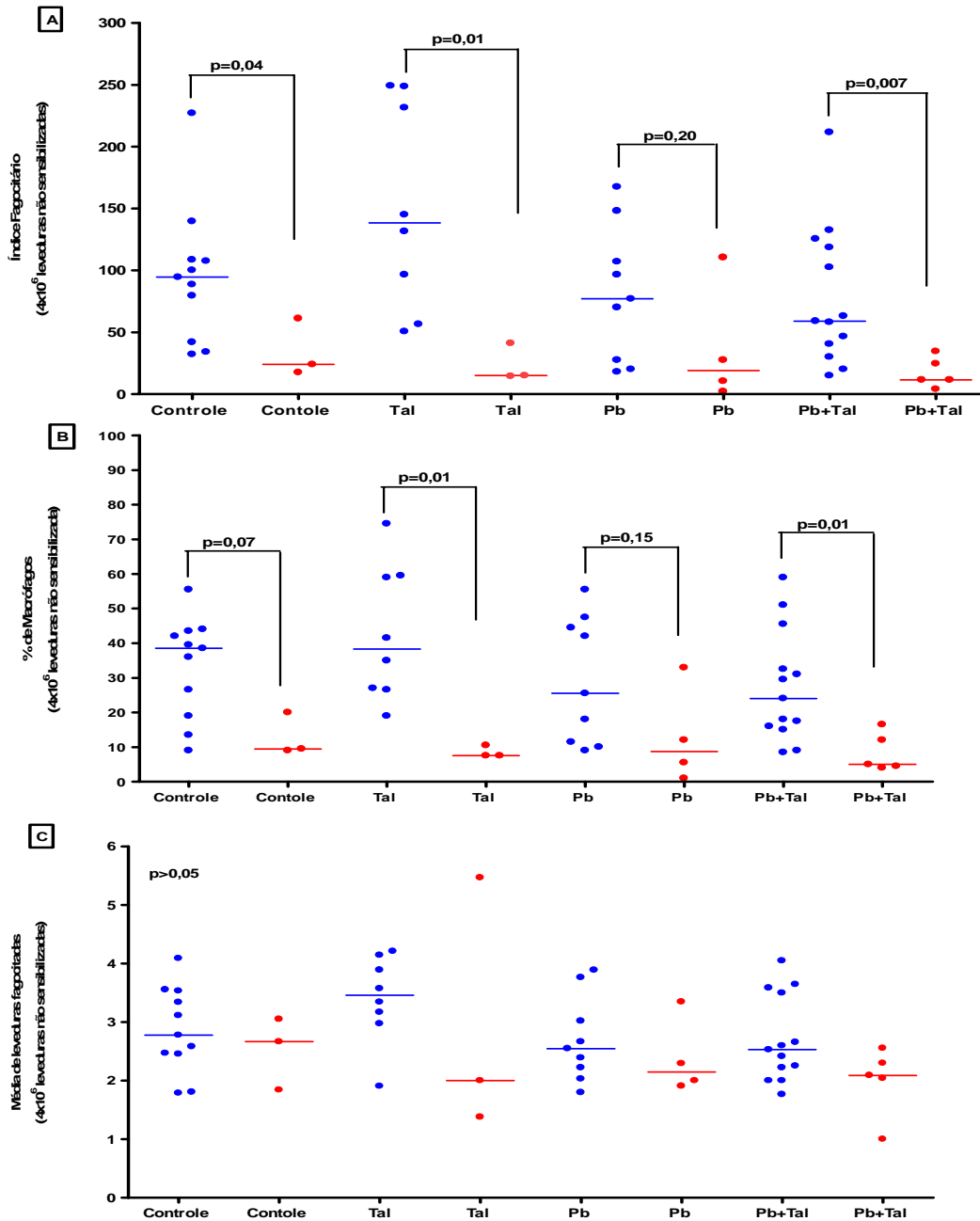
**Figura 34.** Influência da talidomida sobre o índice fagocitário, percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas por macrófagos, nos modelos Balb/C (A, C e E) e CBA (B, D e F) infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: camundongos não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). A fagocitose foi avaliada na presença de soro fetal bovino, utilizando 10<sup>6</sup> leveduras não sensibilizadas. Os testes utilizados foram o de ANOVA para os camundongos Balb/C, e Kruskal-Wallis para os camundongos CBA. O valor de p está descrito em cada gráfico.



**Figura 35.** Influência da talidomida sobre o índice fagocitário, percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas por macrófagos, nos modelos Balb/C (A, C e E) e CBA (B, D e F) infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: camundongos não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). A fagocitose foi avaliada na presença de soro fetal bovino, utilizando 4x10<sup>6</sup> leveduras não sensibilizadas. Os testes utilizados foram o de ANOVA para os camundongos Balb/C, e Kruskal-Wallis para os camundongos CBA. O valor de p está descrito em cada gráfico.



**Figura 36.** Análise comparativa da capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais, utilizando  $10^6$  leveduras não sensibilizadas, entre os modelos Balb/C (●) e CBA (●). A) Camundongos Balb/C apresentaram maior mediana do índice fagocitário em relação aos camundongos CBA, embora o grupo Pb não tenha apresentado significância estatística. B) Camundongos Balb/C apresentaram maior % de macrófagos envolvidos na fagocitose do que os camundongos CBA, embora o grupo Pb não tenha apresentado significância estatística. C) Não houve diferença na quantidade de leveduras fagocitadas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Análises realizadas pelo teste Mann-Whitney. Valores de p foram apresentados nos gráficos.



**Figura 37.** Análise comparativa da capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, entre os modelos Balb/C (●) e CBA (●). A) Camundongos Balb/C apresentam maior mediana do índice fagocitário em relação aos camundongos CBA, embora o grupo Pb não tenha apresentado significância estatística. B) Camundongos Balb/C apresentaram maior % de macrófagos envolvidos na fagocitose do que os camundongos CBA, embora o grupo Pb não tenha apresentado significância estatística e o controle tenha apresentado tendência à significância. C) Não houve diferença na quantidade de leveduras fagocitadas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Análises realizadas pelo teste Mann-Whitney. Valores de p foram apresentados nos gráficos.

#### 4.5.2 Fagocitose pelos receptores para opsoninas

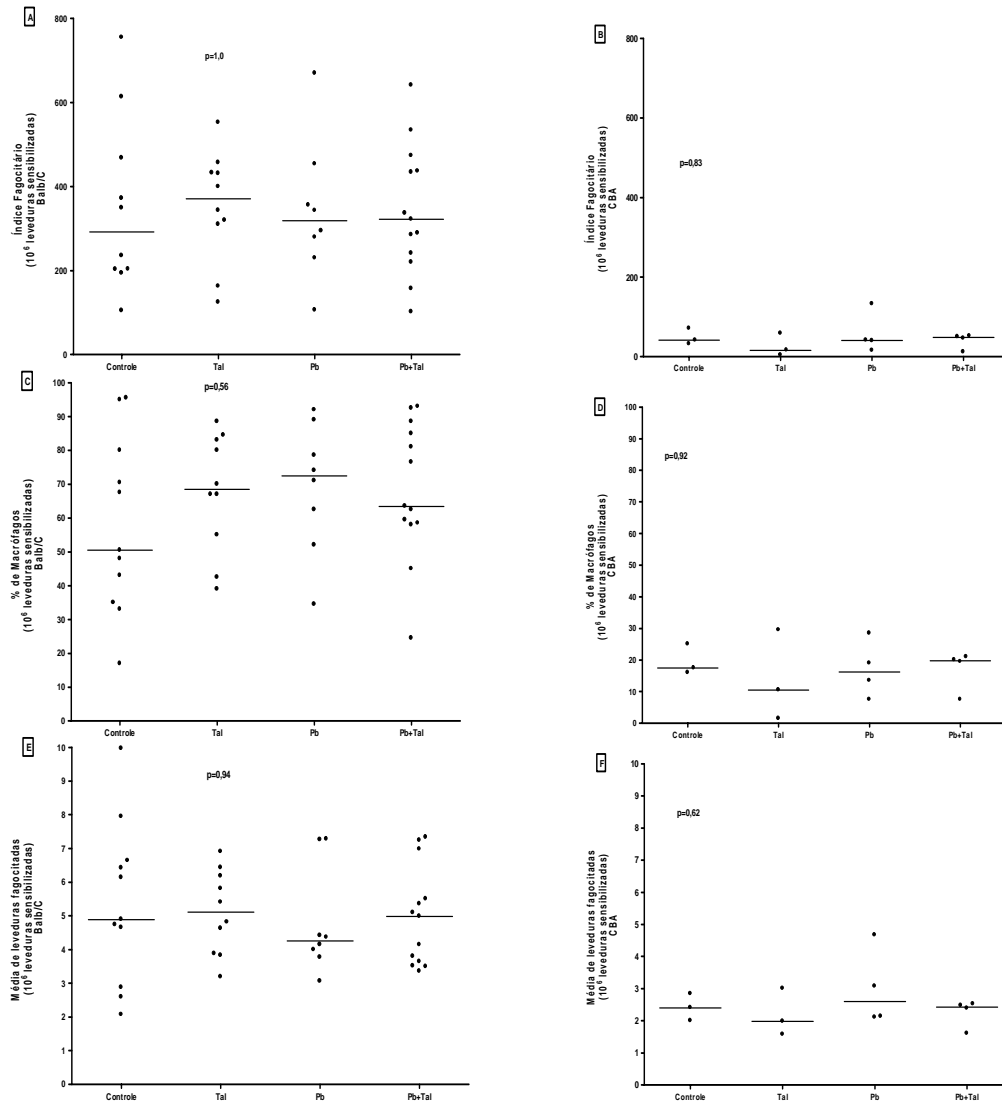
Para avaliar a fagocitose por meio dos receptores para a fração Fc das imunoglobulinas e para receptores para as proteínas do sistema do complemento, os macrófagos obtidos dos quatro grupos estudados foram incubados com duas proporções diferentes de leveduras sensibilizadas ( $10^6$  e  $4 \times 10^6$ ) na presença de soro fresco de camundongo, para os dois modelos estudados (Balb/C e CBA).

Não houve diferença estatística entre as medianas dos índices fagocitários, envolvimento de macrófagos na fagocitose e quantidade de partículas ingeridas/aderidas pelos macrófagos dos camundongos Balb/C e CBA comparando-se os grupos estudados, para as proporções de  $10^6$  e  $4 \times 10^6$  de leveduras sensibilizadas ( $p > 0,05$ , ANOVA e Kruskal-Wallis, respectivamente, **figuras 38 e 39**).

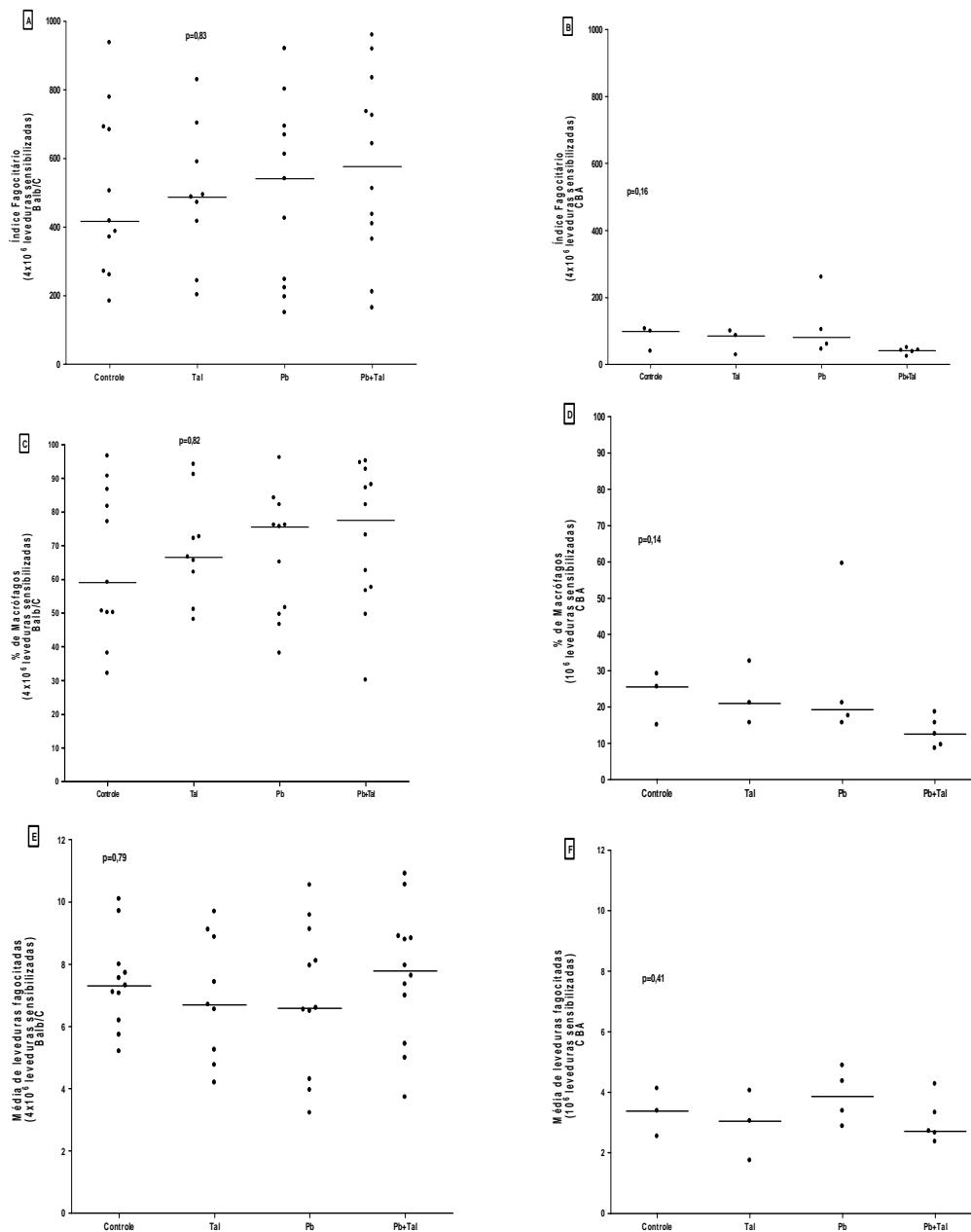
Comparando-se às medianas dos índices fagocitários, envolvimento dos macrófagos na fagocitose e quantidade de partículas ingeridas/aderidas pelos macrófagos nos dois modelos, observamos que todos os grupos dos camundongos Balb/C apresentaram maior mediana do IF do que os animais do grupo CBA, para as duas proporções ( $10^6$  ou  $4 \times 10^6$ ) ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney, **figuras 40 e 41**), exceto o grupo Pb para a proporção de  $10^6$  leveduras ( $p = 0,08$ , Mann-Whitney). Isto foi tanto devido ao maior envolvimento de macrófagos na fagocitose (**figuras 40B e 41B**), quanto a maior quantidade de leveduras ingeridas (**figuras 40C e 41C**), exceto no grupo Pb onde não houve diferença significativa quanto a quantidade de leveduras ingeridas para a proporção de  $10^6$  leveduras



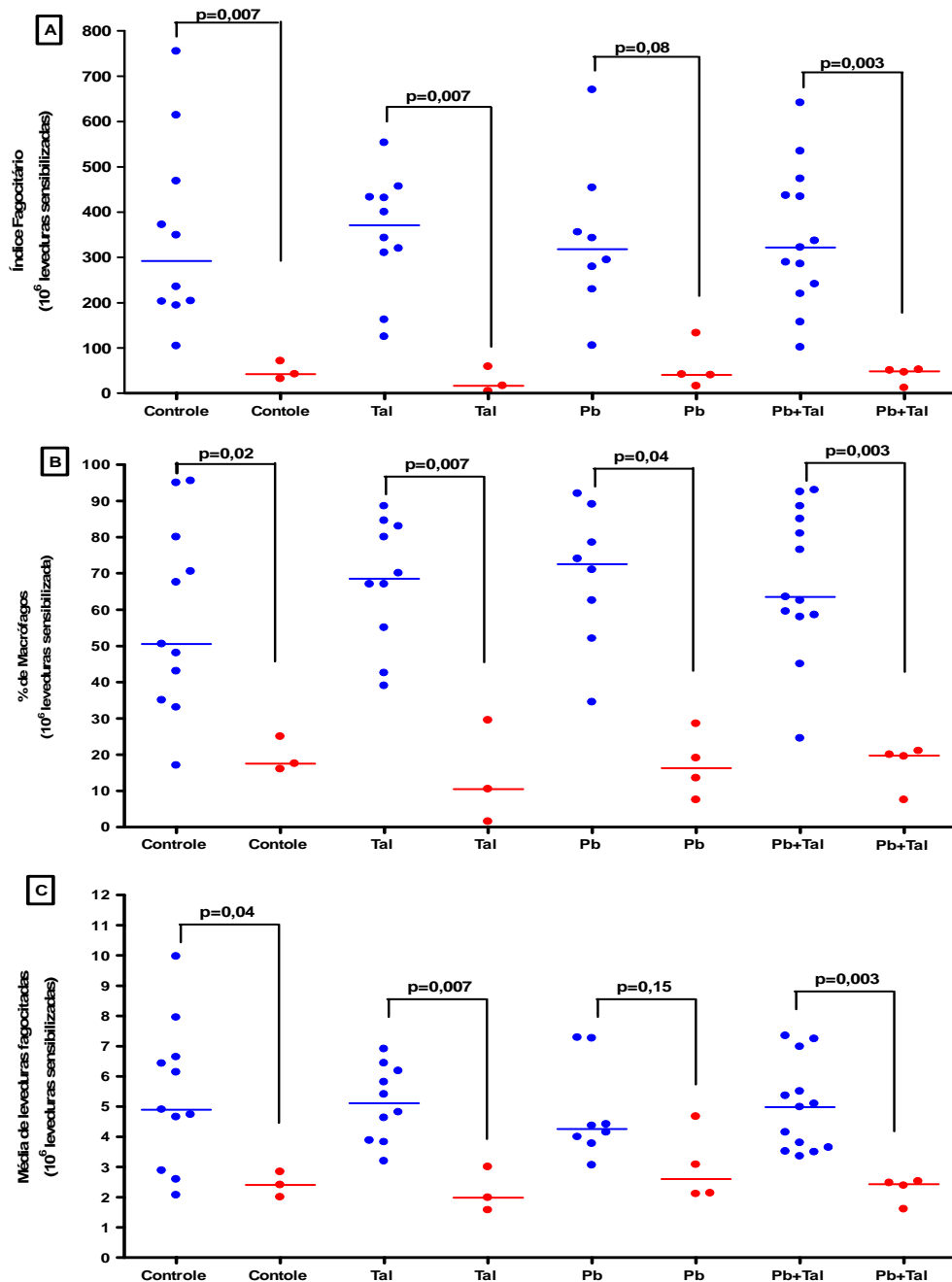
( $p=0,15$ , Mann-Whitney) e  $4 \times 10^6$  leveduras fagocitadas por macrófagos ( $p=0,058$ , Man-Whitney).



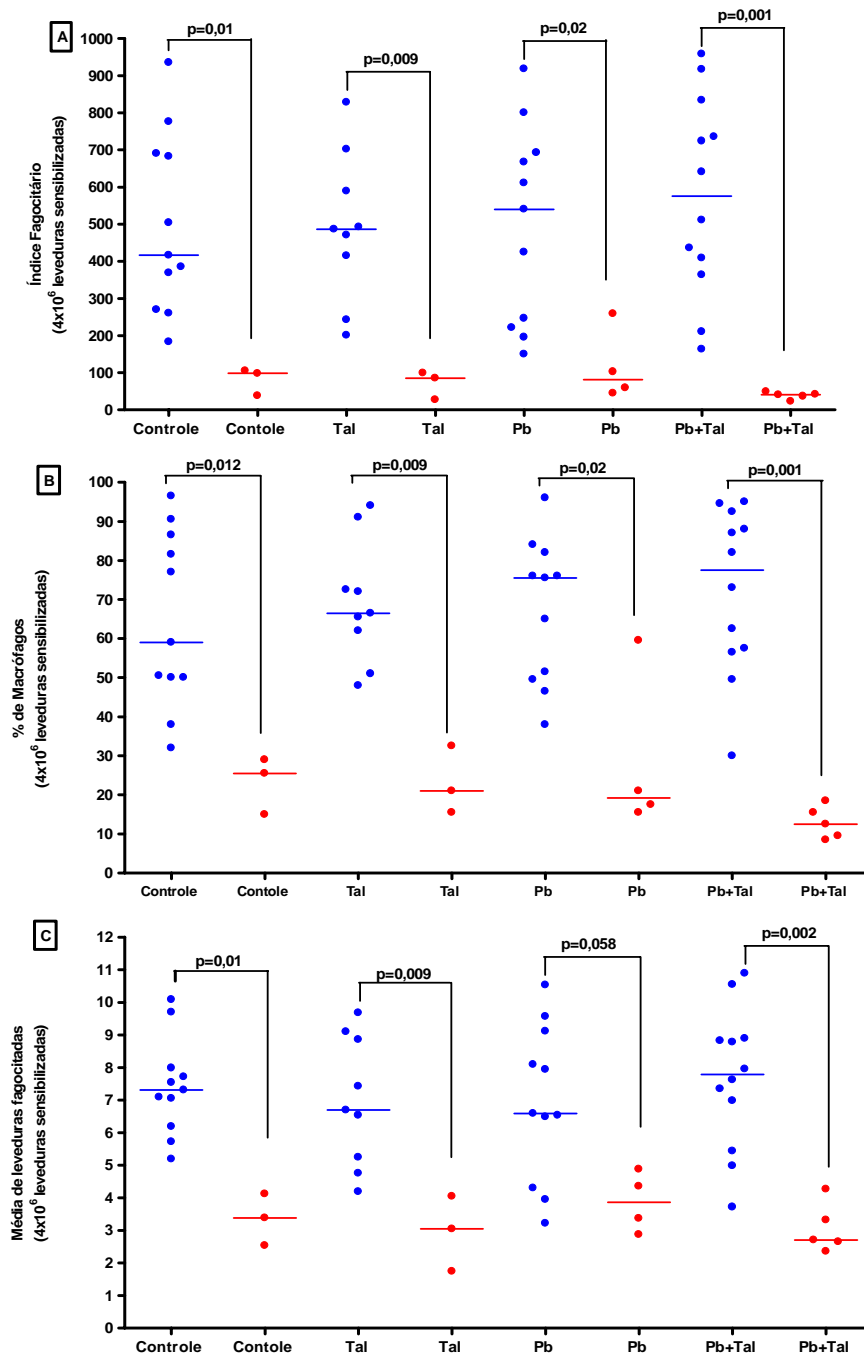
**Figura 38.** Influência da talidomida sobre o índice fagocitário, percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas por macrófagos, nos modelos Balb/C (A, C e E) e CBA (B, D e F) infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: camundongos não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida diluída em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida diluída em sacarose (Pb+Tal). A fagocitose foi avaliada na presença de soro fresco de camundongos, utilizando  $10^6$  leveduras sensibilizadas. Os testes utilizados foram o de ANOVA para os camundongos Balb/C, e Kruskal-Wallis para os camundongos CBA. O valor de  $p$  está descrito em cada gráfico.



**Figura 39.** Influência da talidomida sobre o índice fagocitário, percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas por macrófagos, nos modelos Balb/C (A, C e E) e CBA (B, D e F) infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: camundongos não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida diluída em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida diluída em sacarose (Pb+Tal). A fagocitose foi avaliada na presença de soro fresco de camundongo, utilizando 4x10<sup>6</sup> leveduras sensibilizadas. Os testes utilizados foram o de ANOVA para os camundongos Balb/C, e Kruskal-Wallis para os camundongos CBA. O valor de p está descrito em cada gráfico.



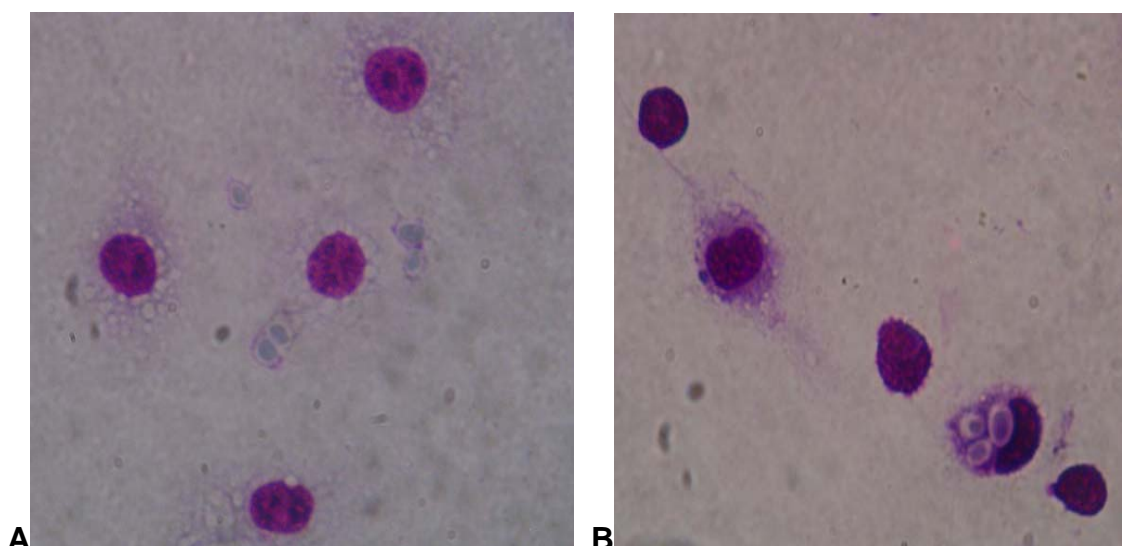
**Figura 40.** Análise comparativa da capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais, utilizando  $10^6$  leveduras sensibilizadas, entre os modelos Balb/C (●) e CBA (●). A) Os macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C apresentaram maior mediana do índice fagocitário em relação aos camundongos CBA, embora o grupo Pb tenha apresentado apenas tendência à significância estatística. B) Os macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C apresentaram maior % de envolvimento na fagocitose do que os macrófagos peritoneais dos camundongos CBA. C) Os macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C apresentaram maior quantidade de leveduras ingeridas/aderidas em relação aos camundongos CBA, exceto para o grupo Pb ( $p > 0,05$ ). Análises realizadas pelo teste Mann-Whitney. Valores de p foram apresentados nos gráficos.



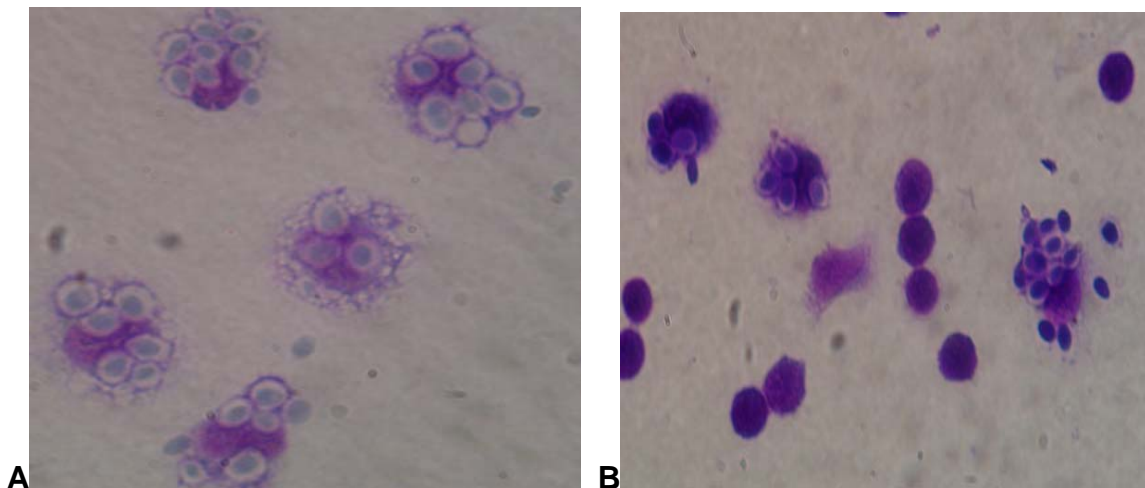
**Figura 41.** Análise comparativa da capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, entre os modelos Balb/C (●) e CBA (●). A) Os macrófagos dos camundongos Balb/C apresentaram maior mediana do índice fagocitário em relação aos camundongos CBA. B) Os macrófagos dos camundongos Balb/C apresentaram maior % de envolvimento na fagocitose do que os macrófagos peritoneais dos camundongos CBA. C) Os macrófagos dos camundongos Balb/C apresentaram maior quantidade de leveduras ingeridas/aderidas em relação aos camundongos CBA, exceto para o grupo Pb onde houve apenas tendência à significância. Análises realizadas pelo teste Mann-Whitney. Valores de p foram apresentados nos gráficos.

### 4.5.3 Aspectos morfológicos da fagocitose

Os aspectos morfológicos da fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* pelos macrófagos peritoneais dos animais estudados encontram-se nas **figuras 42 e 43**. Nestas figuras estão representadas a fagocitose na presença de soro fetal bovino onde foi avaliada a fagocitose pelos receptores para padrões de reconhecimento, e a fagocitose na presença de soro fresco murino onde foi avaliada a fagocitose pelos receptores para opsoninas.



**Figura 42.** Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais de camundongos no 8° de infecção pelo *P. berghei* ANKA, testada por meio de receptores para padrão de reconhecimento, na presença de soro fetal bovino. A) Camundongo Balb/C. B) Camundongo CBA. Aumento 1000x (Panótico).



**Figura 43.** Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais de camundongos no 8º dia de infecção pelo *P. berghei* ANKA, testada por meio de receptores para opsoninas, na presença de soro fresco de camundongos. A) Camundongo Balb/C. B) Camundongo CBA. Aumento 1000x (Panótico).

#### **4.6 Produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA**

A mensuração do FNT pelo teste de ELISA foi realizada tanto no soro quanto nos sobrenadantes das culturas de macrófagos dos camundongos Balb/C e CBA, estimulados ou não com lipopolissacarídeos, com o intuito de avaliar a influência da talidomida na produção de fator de necrose tumoral nestes dois modelos experimentais, durante a infecção malárica pelo *P. berghei* ANKA.

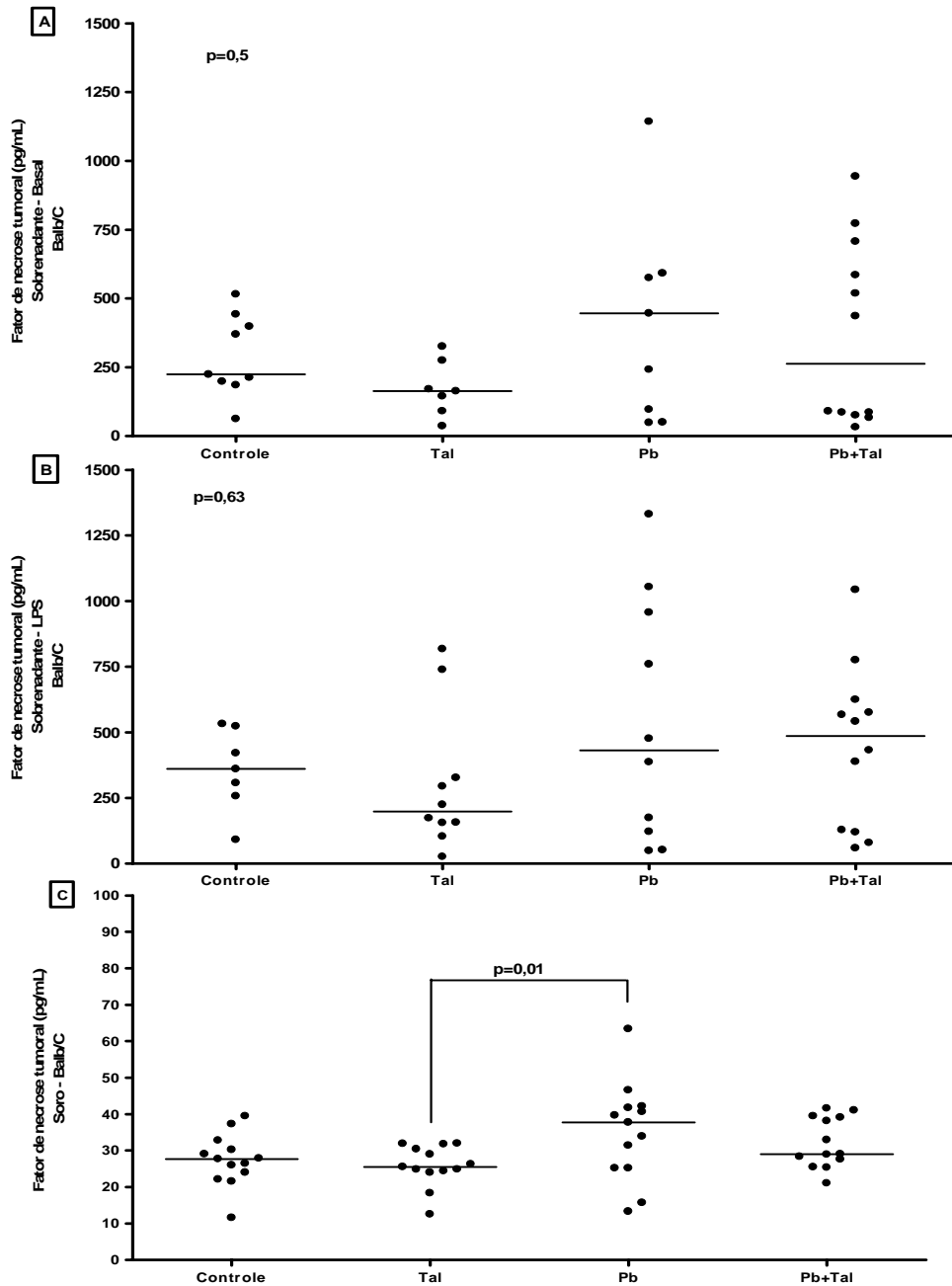
#### 4.6.1 Produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos Balb/C

A infecção malárica e o tratamento com a talidomida não influenciaram a produção de fator de necrose tumoral basal no sobrenadante das culturas de macrófagos dos camundongos Balb/C ( $p=0,5$ , Kruskal-Wallis; **figura 44A**). Entretanto, a infecção malárica duplicou a produção de FNT, sendo a mediana do grupo controle igual a 223,6 e do grupo Pb igual a 445,9. O tratamento com talidomida dos animais infectados diminuiu em 41% a produção desta citocina (mediana do grupo Pb+Tal de 262,9).

Nem a infecção malárica nem o tratamento com talidomida influenciaram a produção do FNT quando as culturas foram estimuladas com LPS ( $p=0,63$ , Kruskal-Wallis; **figura 44B**).

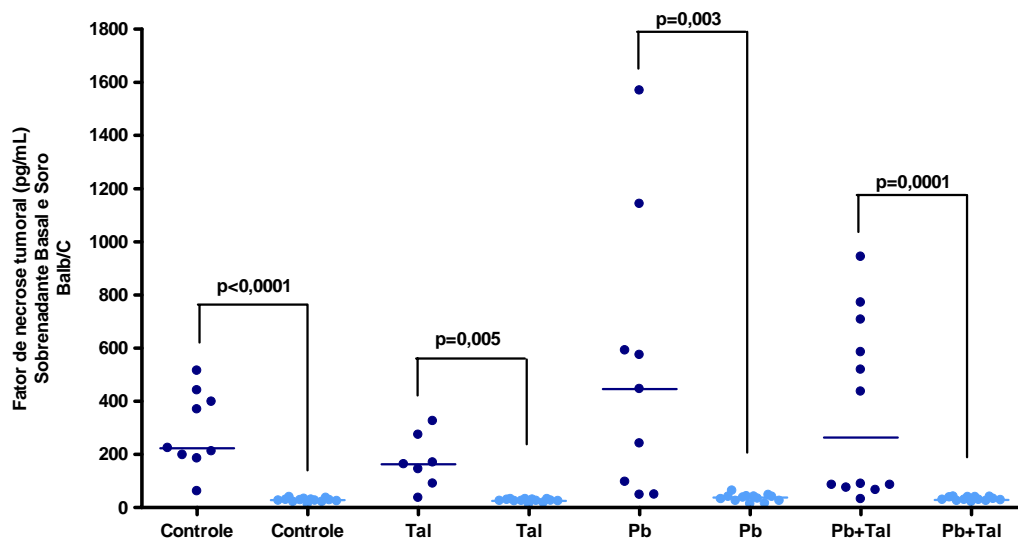
A mediana dos níveis séricos de FNT do grupo infectado pelo *P. berghei* ANKA (Pb=37,7) foi maior do que a do grupo tratado apenas com talidomida (Tal=25,5) ( $p<0,05$ , ANOVA; **figura 44C**). A infecção malárica aumentou em 36,2% a produção sérica de FNT (mediana do grupo controle igual a 27,7; e do grupo Pb igual a 37,7). O tratamento dos animais infectados reduziu em 23,1% esta produção (mediana do grupo Pb+Tal igual a 29).

As concentrações de FNT foram mais elevadas no sobrenadante das culturas do que no soro dos animais ( $p<0,01$ , teste *t* e Mann-Whitney; **figura 45**).



**Figura 44.** Influência da talidomida sobre a produção basal e estimulada de fator de necrose tumoral por macrófagos peritoneais, *in vitro*, e sobre os níveis séricos desta citocina, no oitavo dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA nos camundongos Balb/C, nos seguintes grupos: animais não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). A) Produção basal de FNT quantificado no sobrenadante das culturas de macrófagos ( $p>0,05$ , teste de Kruskal-Wallis). B) Produção de FNT quantificado nas culturas de macrófagos após estímulo com LPS ( $p>0,05$ , teste de Kruskal-Wallis). C) Produção sérica de FNT. Houve diminuição da produção sérica de FNT do grupo Tal em relação ao grupo infectado ( $p=0,01$ , teste ANOVA).





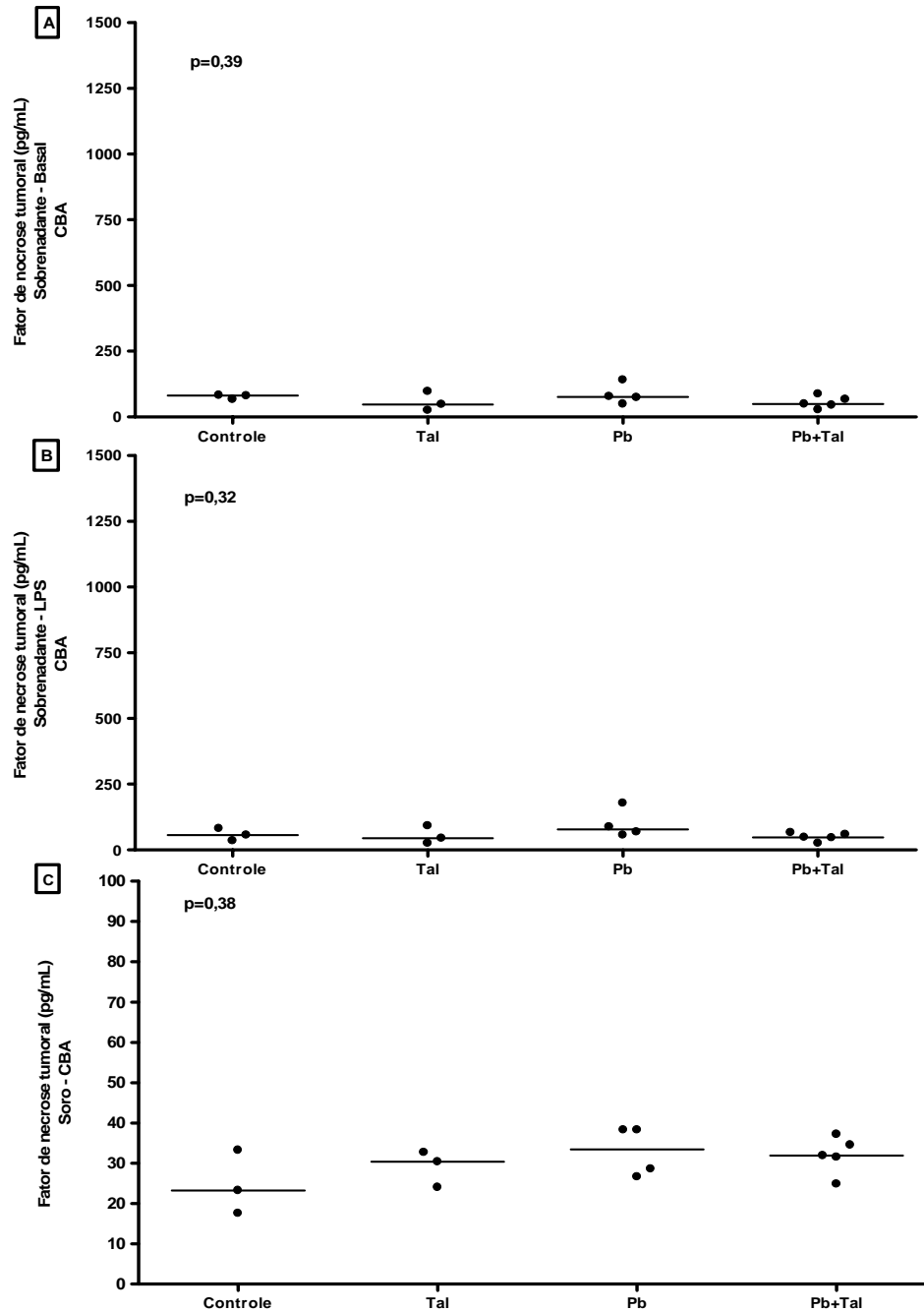
**Figura 45.** Análise comparativa entre os níveis de FNT no sobrenadante (●) das culturas de macrófagos peritoneais e no soro (●) no oitavo dia de infecção pelo *P. berghei* ANKA nos camundongos Balb/C, nos seguintes grupos: animais não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). Os níveis de FNT no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais foram significativamente maiores do que os níveis séricos. Foram utilizados os testes *t* para os grupos Controle e Pb e teste Mann-Whitney para os grupos Tal e Pb+Tal. Os valores do *p* estão expressos no gráfico.

#### 4.6.2 Produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos CBA

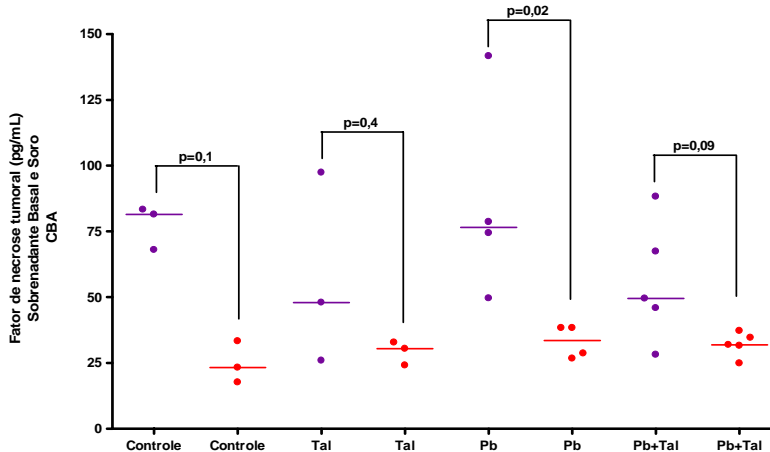
Nos camundongos CBA, nem a infecção malárica nem o tratamento com talidomida influenciaram a produção de fator de necrose tumoral basal ( $p=0,39$ , Kruskal-Wallis; **figura 46A**) ou estimulada por LPS ( $p=0,32$ , Kruskal-Wallis; **figura 46B**). Embora não tenha havido aumento significativo da produção de FNT basal pela infecção, os animais tratados, infectados ou não, apresentaram redução da produção desta citocina em 35,3% e 41%, respectivamente (medianas: Controle = 81,4; Tal = 44,8; Pb = 76,5; Pb+Tal = 49,5). Este efeito também foi observado após estímulo com LPS, com redução da produção de FNT em 21,7% e 38,4%,

respectivamente (medianas: Controle = 57,2; Tal = 44,8; Pb = 78,73; Pb+Tal = 48,5).

Não houve diferença estatística na concentração sérica de FNT entre os quatro grupos estudados ( $p=0,38$ , Kruskal-Wallis; **figura 46C**). Entretanto, a infecção aumentou em 44% a produção sérica desta citocina em relação ao grupo controle (medianas: Controle = 23,2; Pb = 33,5). As concentrações de FNT foram mais elevadas no sobrenadante das culturas do que no soro dos animais (**figura 47**), porém tal elevação só foi significativa nos grupo Pb ( $p=0,02$ , Mann-Whitney).



**Figura 46.** Influência da talidomida sobre a produção basal e estimulada de fator de necrose tumoral por macrófagos peritoneais, *in vitro*, e sobre os níveis séricos desta citocina, no oitavo dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA nos camundongos Balb/C, nos seguintes grupos: animais não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). A) Produção basal de FNT quantificado no sobrenadante das culturas de macrófagos ( $p > 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis). B) Produção de FNT quantificado nas culturas de macrófagos após estímulo com LPS ( $p > 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis). C) Produção sérica de FNT. Não houve diferença significativa da produção sérica de FNT entre os quatro grupos ( $p = 0,38$ , teste de Kruskal-Wallis).

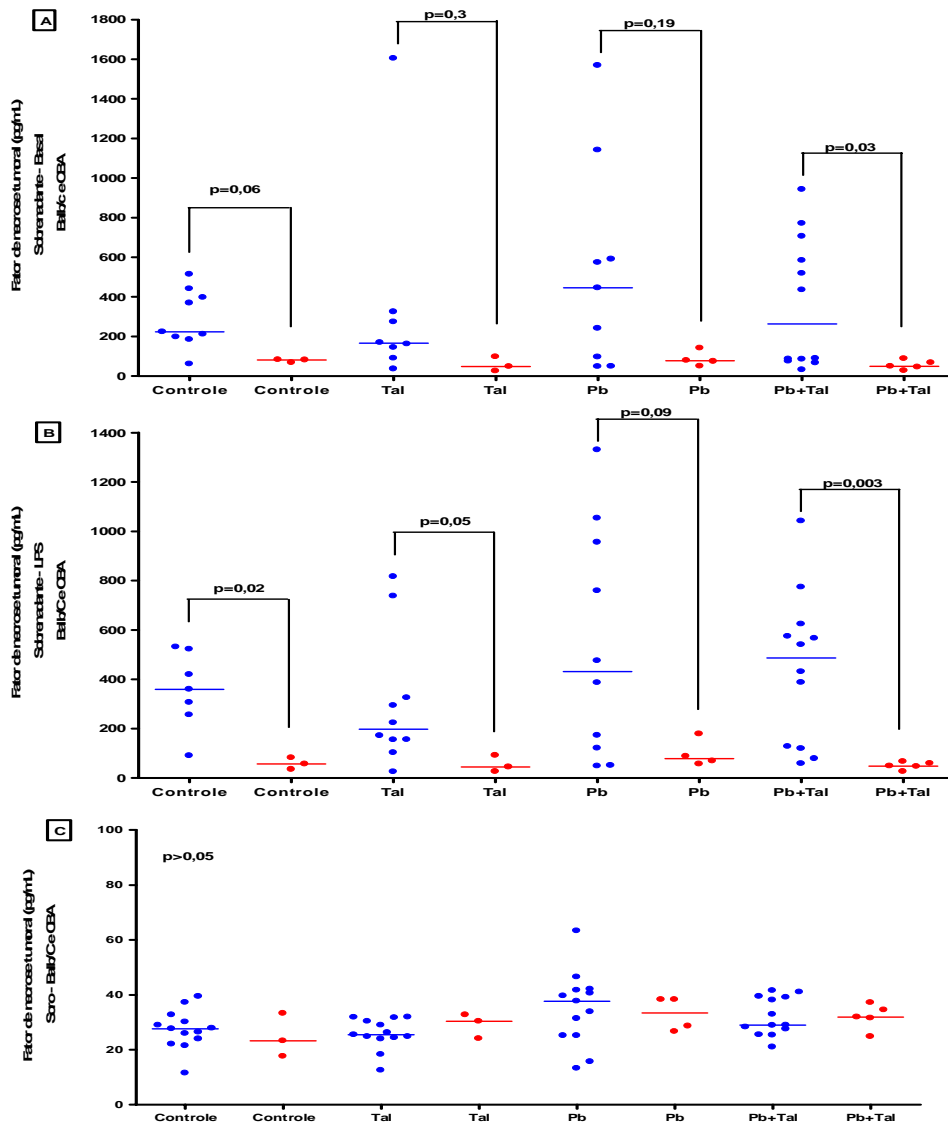


**Figura 47.** Análise comparativa entre os níveis de FNT no sobrenadante (●) das culturas de macrófagos peritoneais e no soro (●) no oitavo dia de infecção pelo *P. berghei* ANKA nos camundongos CBA nos seguintes grupos: animais não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). Os níveis de FNT no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais foram maiores do que os níveis séricos, porém apenas o grupo Pb apresentou diferença estatística e o grupo Pb+Tal apresentou tendência a significância. Foi utilizado o teste Mann-Whitney. Os valores do p estão expressos no gráfico.

#### 4.6.3 Análise comparativa da produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos Balb/C e CBA

Observamos que a produção basal e após estímulo com LPS de FNT nos sobrenadantes das culturas dos macrófagos pelos camundongos Balb/C foi maior que a dos camundongos CBA. Contudo, apenas o grupo Pb+Tal dos camundongos Balb/C apresentaram diferença significativa quanto à produção basal de FNT ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney; **figura 48A**). Observamos que as culturas dos sobrenadantes estimuladas por LPS dos camundongos Balb/C apresentaram produção significativa maior de FNT do que as dos camundongos CBA, exceto no grupo Pb ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney; **figura 48B**).

Entretanto não houve diferença na produção sérica de FNT nos dois modelos entre os quatro grupos estudados ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney; **figura 48C**).

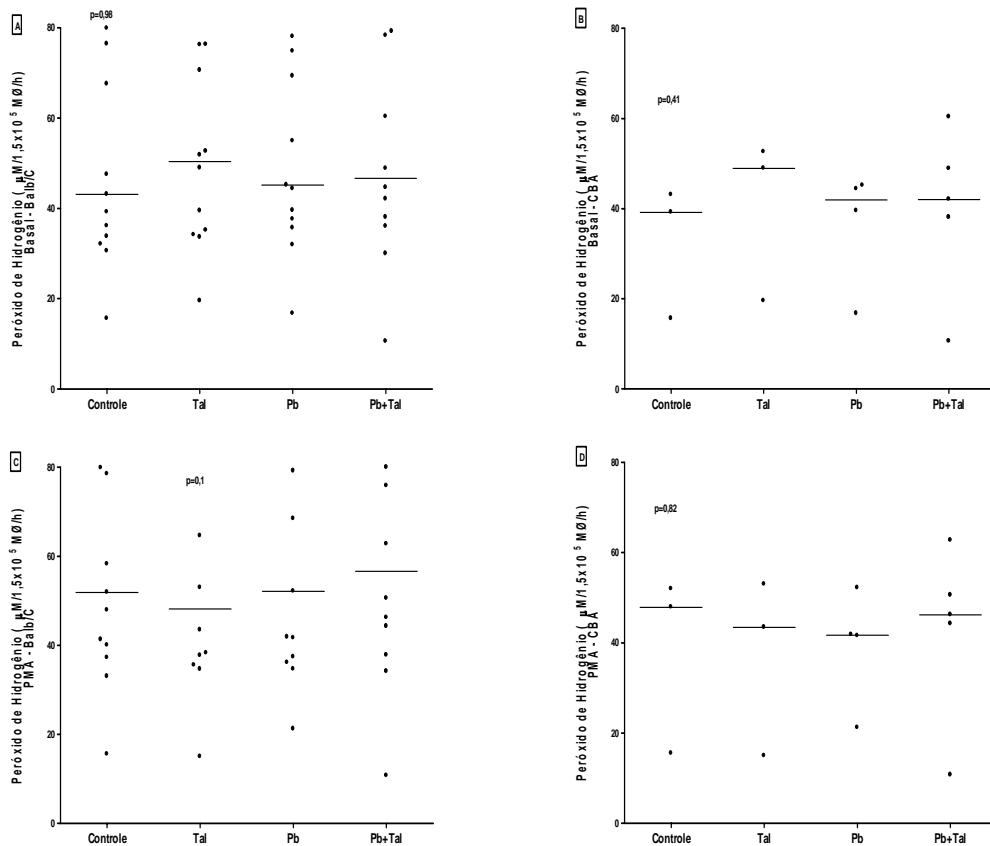


**Figura 48.** Análise comparativa da influência da talidomida sobre a produção basal e após estímulo com LPS de fator de necrose tumoral por macrófagos peritoneais, *in vitro*, e sobre os níveis séricos desta citocina, no oitavo dia de infecção do *Plasmodium berghei* ANKA nos camundongos Balb/C (●) e CBA (●), nos seguintes grupos: animais não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). A) Comparação entre a produção basal de FNT quantificado no sobrenadante das culturas de macrófagos dos camundongos Balb/C e CBA. B) Comparação entre a produção de FNT quantificado nas culturas de macrófagos após estímulo com LPS dos camundongos Balb/C e CBA. C) Comparação entre a produção de FNT no soro de camundongos Balb/C e CBA. O teste utilizado foi Mann-Whitney e os valores do p foram descritos nos gráficos.

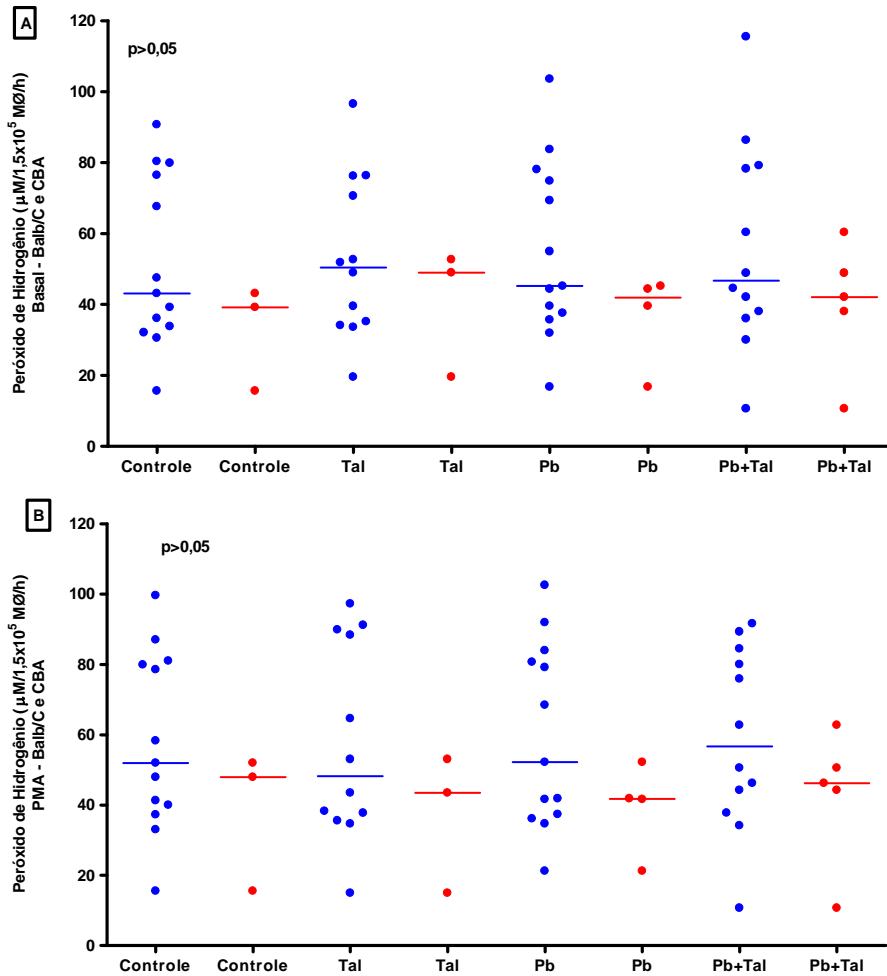
#### **4.7 Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C e CBA na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA**

A produção basal e após estímulo com PMA de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais dos dois modelos de camundongos foi avaliada no oitavo dia da infecção malárica com o intuito de verificar a influência da talidomida sobre a produção deste radical livre.

Não observamos diferença estatística na produção de peróxido de hidrogênio basal ou após estímulo com PMA pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C ( $p=0,98$  e  $p=0,1$ ; respectivamente, ANOVA, **figuras 49A e C**) ou CBA ( $p=0,65$  e  $p=0,94$ ; respectivamente, Kruskal-Wallis, **figuras 49B e D**), nem houve diferença entre os dois modelos (**figuras 50A e B**).



**Figura 49.** Influência da talidomida sobre a produção, *in vitro*, de peróxido de hidrogênio pelos camundongos Balb/C e CBA nos seguintes grupos: animais não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). A) Produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C,  $p>0,05$ , ANOVA. B) Produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA,  $p>0,05$ , Kruskal-Wallis. C) Produção de peróxido de hidrogênio após estímulo com PMA pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C,  $p>0,05$ , ANOVA. D) Produção de peróxido de hidrogênio após estímulo com PMA pelos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA,  $p>0,05$ , Kruskal-Wallis.



**Figura 50.** Análise comparativa da influência da talidomida sobre a produção basal e após estímulo com PMA, *in vitro*, de peróxido de hidrogênio pelos camundongos Balb/C (●) e CBA (●) nos seguintes grupos: camundongos não infectados tratados com sacarose (Controle) ou talidomida em sacarose (Tal), animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). A) Produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C e CBA,  $p > 0,05$ , Mann-Whitney. B) Produção de peróxido de hidrogênio após estímulo com PMA pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C e CBA,  $p > 0,05$ , Mann-Whitney.

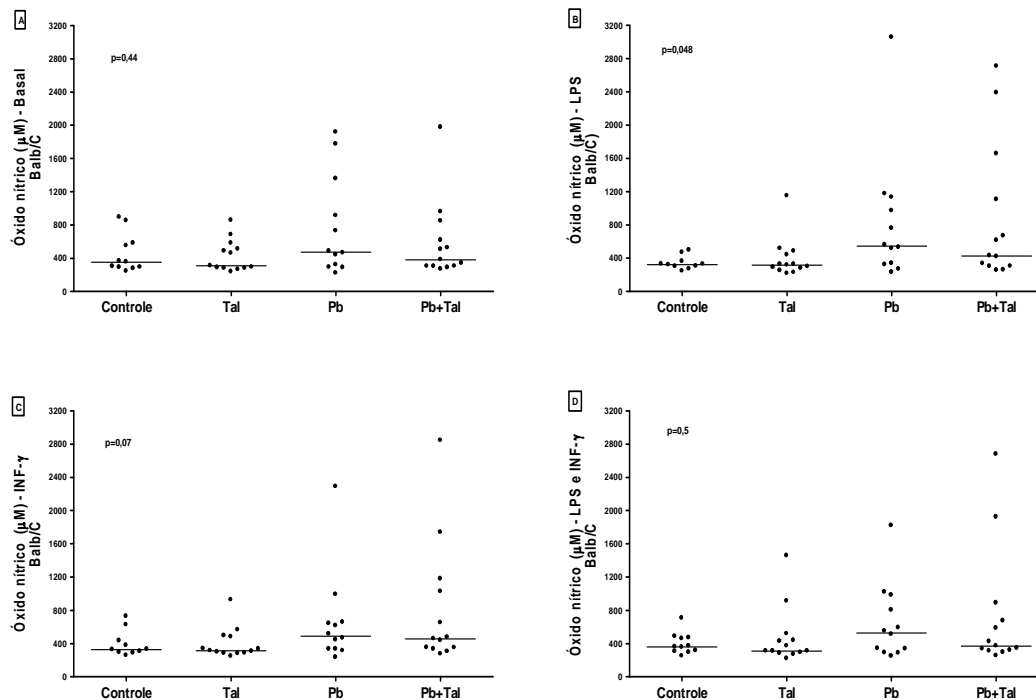


#### **4.8 Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C e CBA na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA**

Avaliamos a influência da talidomida sobre a produção de óxido nítrico, *in vitro*, no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C e CBA, no oitavo dia da infecção malárica, pela técnica de Griess. Avaliamos a produção basal, após estímulo com lipopolissacarídeo e/ou interferon- $\gamma$  nos quatro grupos estudados.

##### **4.8.1 Produção de óxido nítrico pelos camundongos Balb/C**

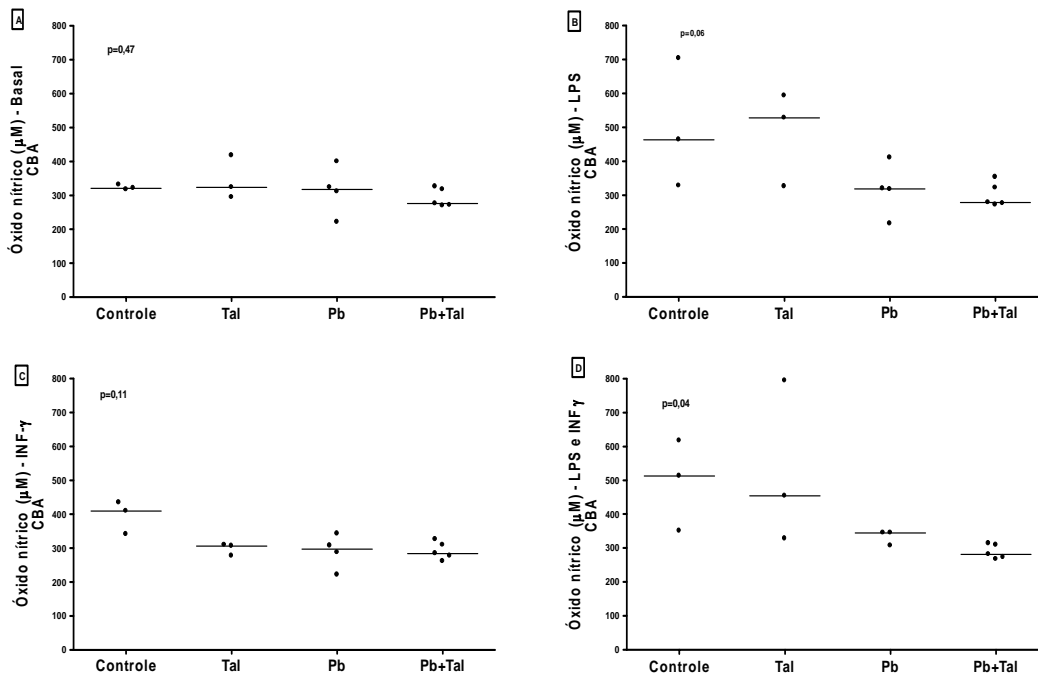
Não foi possível detectar, nos camundongos Balb/C, diferença estatística na produção basal nem após estímulo com LPS e INF- $\gamma$ , concomitantemente, entre os quatro grupos estudados ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis, **figuras 51A e D**). Porém, quando estes estímulos foram administrados separadamente, houve aumento significativo na produção de óxido nítrico na presença de LPS em cultura pelos dois grupos infectados ( $p = 0,048$ , Kruskal-Wallis, **figura 51B**). Embora sem significância estatística, a infecção malárica aumentou a produção de óxido nítrico em relação ao grupo controle e o tratamento dos animais infectados com talidomida modulou negativamente este aumento, porém, os níveis de óxido nítrico ainda permaneceram superiores aos do grupo controle, nos animais tratados.



**Figura 51.** Influência da talidomida sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não pelo *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: animais não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). A) Produção basal. B) Produção após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS). C) Produção após estímulo com interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). D) Produção após estímulo com LPS e INF- $\gamma$ . O teste utilizado foi o Kruskal-Wallis seguido do método comparativo de Dunn. O valor do p está descrito em cada gráfico.

#### 4.8.2 Produção de óxido nítrico pelos camundongos CBA

No modelo CBA, não foi possível detectar diferença estatística na produção de óxido nítrico basal ou após estímulo com INF- $\gamma$  ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis, **figuras 52A e C**). Contudo, houve diminuição na produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos animais infectados, tratados ou não, após estímulo com LPS e INF- $\gamma$  concomitantemente ( $p = 0,04$ , Kruskal-Wallis, **figura 52D**) e após o uso do LPS ( $p = 0,06$ , Kruskal-Wallis, **figura 52B**).

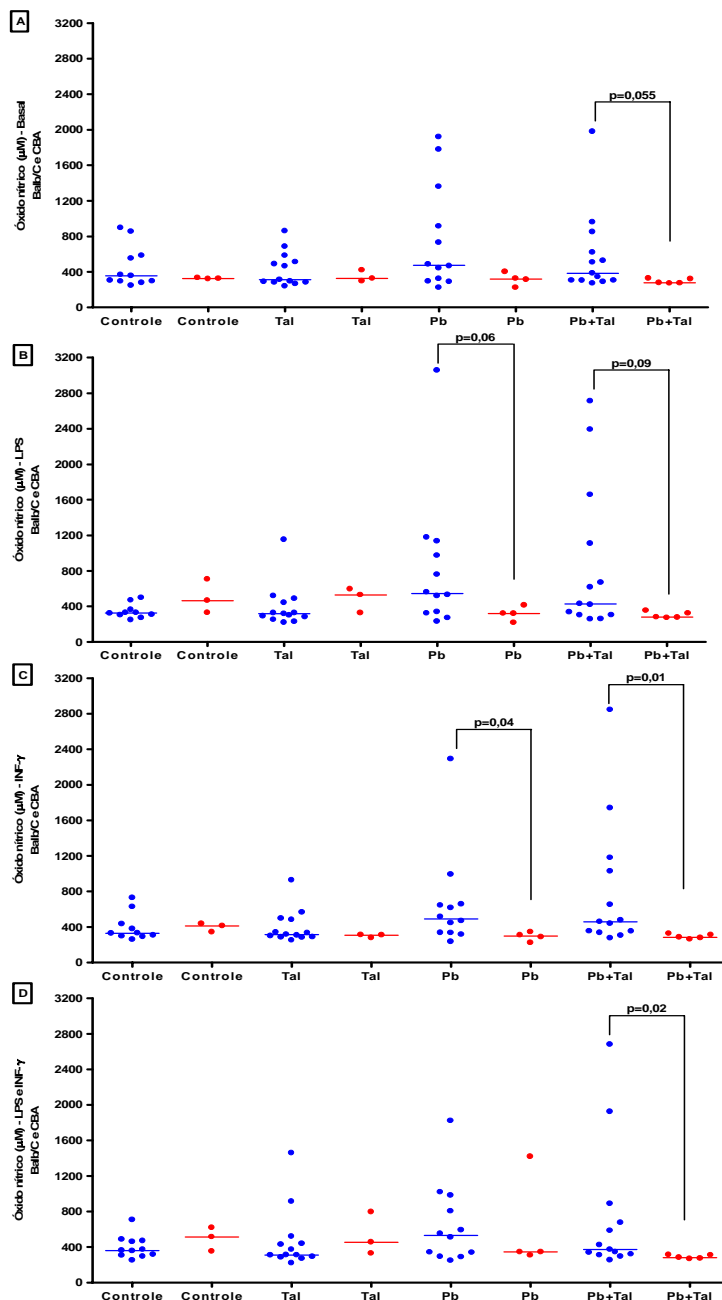


**Figura 52.** Influência da talidomida sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: animais não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). A) Produção basal. B) Produção após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS). C) Produção após estímulo com interferon gama (INF- $\gamma$ ). D) Produção após estímulo com LPS e INF- $\gamma$ . O teste utilizado foi o Kruskal-Wallis. O valor de p está descrito em cada gráfico.

#### 4.8.3 Análise comparativa da produção de óxido nítrico pelos camundongos Balb/C e CBA

Tanto a infecção quanto o tratamento com talidomida dos camundongos Balb/C infectados, ocasionou maior produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais do que o dos camundongos CBA, com ou sem estímulo. Os camundongos Balb/C infectados e infectados e tratados com talidomida apresentaram produção de 49,1% e 38,7% (p=0,055, Mann-Whitney),

respectivamente, de óxido nítrico basal a mais que os camundongos CBA (**figura 53A**). Quando os macrófagos dos animais infectados e infectados e tratados foram estimulados com LPS, os camundongos Balb/C apresentaram produção de 70,6% ( $p=0,06$ , Mann-Whitney) e 54,1% ( $p=0,09$ , Mann-Whitney), respectivamente, maior que a dos camundongos CBA (**figura 53B**). Quando o estímulo administrado foi o  $\text{INF-}\gamma$ , a diferença foi de 65% ( $p=0,04$ , Mann-Whitney) e 61% ( $p=0,01$ , Mann-Whitney) maior, respectivamente, na produção de óxido nítrico pelos camundongos Balb/C em relação aos camundongos CBA (**figura 53C**). Quando os estímulos LPS e  $\text{INF-}\gamma$  foram administrados concomitantemente, os camundongos Balb/C apresentaram produção de 53,6% e 32,3% ( $p=0,02$ , Mann-Whitney), respectivamente, a mais de óxido nítrico que os camundongos CBA (**figura 53D**).



**Figura 53.** Análise comparativa da influência da talidomida sobre a produção de óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C (●) e CBA (●) infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: animais não infectados tratados com sacarose (Controle) ou com talidomida em sacarose (Tal), animais infectados tratados com sacarose (Pb) ou com talidomida em sacarose (Pb+Tal). A) Produção basal. B) Produção após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS). C) Produção após estímulo com interferon gama ( $\text{INF-}\gamma$ ). D) Produção após estímulo com LPS e  $\text{INF-}\gamma$ . O teste utilizado foi o Kruskal-Wallis seguido do método comparativo de Dunn. O valor do p está descrito em cada gráfico.

**Todos os resultados estão dispostos em tabelas no final desta dissertação no Anexo de**

**Tabela**

**DISCUSSÃO**

A malária apresenta mecanismos imunopatológicos complexos e ainda pouco esclarecidos. Muito do conhecimento atualmente disponível foi obtido por estudos utilizando diferentes modelos animais. Dentre esses, várias linhagens de camundongos ganham destaque e as combinações entre diferentes espécies de plasmódio murino e cepas de camundongos podem reproduzir alterações semelhantes às que ocorrem nos seres humanos (Lou e cols, 2001; Souza e Riley, 2002; Combes e cols, 2005; Lamb e cols, 2006). Neste trabalho foram estudados dois modelos de camundongos: camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, e CBA, susceptíveis à malária cerebral; ambos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, no intuito de avaliar o efeito da talidomida sobre a evolução da doença e a resposta imunitária dos animais resistentes à malária cerebral.

Neste trabalho, camundongos da linhagem Balb/C e CBA foram infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com talidomida, sendo que o tratamento foi iniciado no terceiro dia da infecção para evitar a inibição do efeito antiparasitário do FNT sobre o *P. berghei* ANKA (Muniz-Junqueira e cols, 2001). A dose utilizada da talidomida foi de 150 mg/Kg/dia, a cada 24 horas, por via oral, conforme previamente descrito (Hauschild e cols, 1997; Karrow e cols, 2000; Muniz-Junqueira e cols, 2005), diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M, com o objetivo de facilitar a administração por via oral. Entretanto, desde que há um substrato fisiopatológico relacionado com a hipoglicemia apresentada pelos pacientes com malária grave, foi incluído um grupo, posteriormente, para caracterizar a influência da sacarose sobre a infecção. =

Com o objetivo de verificar se o tratamento com talidomida influenciava de maneira geral a evolução da doença malárica nos camundongos Balb/C e CBA, o peso, o hematócrito, a carga parasitária e a sobrevivência foram avaliados durante todo o período da infecção até o óbito dos animais. Como a talidomida administrada foi diluída em uma solução de sacarose, também verificamos se a sacarose *per se* influenciava a evolução da doença.

Nossos dados mostraram que os tratamentos com talidomida e com talidomida em sacarose não influenciaram a sobrevivência dos camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA em relação aos animais tratados com água destilada, porém o tratamento apenas com sacarose foi deletério, uma vez que os animais deste grupo morreram mais precocemente.

Aljada e cols (2006) e Mohanty e cols (2000) constataram que a ingestão de 75 g de glicose em 300 mL de água por adulto de aproximadamente 70 Kg (solução de sacarose a 25% ou 1M) aumentou a geração de espécies reativas de oxigênio pelos leucócitos e induziu aumento agudo da expressão e atividade de cinases, como a IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , responsáveis pela fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$ , passos importantes para a ativação do NF $\kappa$ B. O I $\kappa$ B $\alpha$  é o inibidor do NF $\kappa$ B e quando fosforilado, libera o sítio de translocação do NF $\kappa$ B para o núcleo onde exerce seu papel induzindo a transcrição do ADN de várias citocinas inflamatórias, entre elas o FNT (Li e Stark, 2002; Bottex-Gauthier e cols, 2002). A ingestão de glicose também diminuiu a expressão de I $\kappa$ B $\alpha$  e aumentou a expressão do ARNm do FNT (Aljada e cols, 2006). Portanto, estes dados sugerem que a ingestão de glicose estimula a resposta inflamatória e oxidativa, e tem sido apontada como fator complicador em várias patologias crônicas, como as doenças cardiovasculares e diabetes (Aljad e cols, 2006; Dib, 2006).



Nos nossos experimentos, os animais receberam diariamente uma solução de 0,8M de sacarose, que correspondeu a ingestão de 20 mg em 100  $\mu$ l de uma solução de sacarose a 20%, sendo provável que o açúcar tenha estimulado a resposta inflamatória. Além disto, a administração da sacarose pode ter tido ação sinérgica ao estímulo pró-inflamatório causado pela própria doença malárica, agravando a evolução da doença e diminuindo a sobrevivência dos camundongos. Entretanto, como a talidomida diluída em sacarose não influenciou a sobrevivência dos animais infectados, esta associação deve ter modulado a resposta inflamatória excessiva causada pelo sinergismo da sacarose e da infecção, pela inibição do FNT, e modulação da resposta imunitária (Sampaio e cols, 1991; Moreira e cols, 1993; Keifer e cols, 2001).

No modelo susceptível, enquanto que 60% dos animais CBA tratados apenas com sacarose estavam mortos no décimo dia, 70% dos camundongos CBA tratados com talidomida em sacarose morreram apenas a partir do vigésimo dia de infecção. Entretanto, embora a maioria dos animais tratados com a talidomida morreu mais tardiamente, não houve diferença estatística entre os dois grupos, uma vez que os animais começaram e terminaram de morrer no mesmo dia. Muniz-Junqueira e cols (2005) encontraram efeito protetor da talidomida sobre a infecção malárica no mesmo modelo de camundongo.

Avaliamos a influência da talidomida na evolução da parasitemia dos camundongos Balb/C e CBA. O tratamento dos camundongos Balb/C apenas com talidomida retardou apenas a elevação inicial da parasitemia. Não estão claros os mecanismos determinantes deste retardo no aumento da parasitemia. É possível que esta ação tenha ocorrido de forma indireta, pelo aumento dos

mecanismos de defesa antiparasitários, já que a talidomida não tem ação antiparasitária direta (Ramirez-Villafuert, 1998; Franks e cols, 2004; Muniz-Junqueira e cols, 2005). A maioria dos animais Balb/C não tratados morreu a partir do vigésimo quarto dia de infecção com parasitemia de 45,8% e hematócrito de 25%. Nossos dados são compatíveis com os descritos previamente para camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA, de que eles morrem por volta da terceira semana de infecção com hiperparasitemia e anemia grave, sem sinais de comprometimento do sistema nervoso (Grau e cols, 1987; Pierrot e cols, 2003; Lamb e cols, 2006; Borges, 2006).

O tratamento com talidomida retardou a evolução da parasitemia até o nono dia de infecção dos camundongos Balb/C, enquanto que o tratamento com sacarose aumentou a parasitemia no início da infecção. Contudo, a associação da talidomida com a sacarose não influenciou a parasitemia no início da infecção em relação aos animais tratados apenas com sacarose, porém aumentou a parasitemia em relação aos animais tratados com água destilada. Na fase intra-eritrocitária, o plasmódio obtém a maior parte de suas necessidades energéticas pela glicólise. Eritrócitos infectados pelo plasmódio utilizam a glicose 100 vezes mais rápido que os eritrócitos não infectados (Roth, 1988), e parece haver uma via diferenciada de difusão da glicose em hemácias parasitadas (Neame e Homewood, 1975; Tanabe, 1990), sendo que a absorção intracelular da glicose pelo parasita parece ocorrer principalmente de forma passiva (Kirk e cols, 1996). É possível que a sacarose administrada tenha servido de substrato ao parasita no seu metabolismo, propiciando o aumento discreto da parasitemia por nós observado.

Quase 70% dos camundongos CBA infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados com sacarose morreram por volta do décimo dia de infecção com parasitemia de 13,1%, hematócrito de 48,5% e sinais de comprometimento neurológico. Entretanto, 25% dos animais morreram entre o décimo quinto e vigésimo terceiro dia de infecção, com parasitemia de 28% e hematócrito de 23%, sem sinais de comprometimento neurológico, mas apresentando apatia, eriçamento de pêlo, dispnéia e palidez de mucosa. Nossos dados são similares aos observados previamente de que 10% a 20% dos camundongos CBA infectados pelo *P. berghei* ANKA não apresentam sinais de malária cerebral e morrem por outras complicações da malária, como anemia grave e hiperparasitemia, por volta da terceira semana da infecção (Grau e cols, 1987; Carvalho e cols, 2000). Tem sido sugerido que tal fenômeno ocorra por fatores individuais que alteram a expressão de moléculas de adesão na microcirculação dos vasos (Carvalho e cols, 2000).

A talidomida diluída em sacarose não influenciou a evolução da parasitemia nos camundongos CBA em relação aos tratados apenas com sacarose.

Observamos diferença na média de peso no dia da inoculação entre os camundongos Balb/C dos diferentes grupos de tratamento e entre os camundongos Balb/C e CBA. Para possibilitar a comparação da evolução do peso nos diferentes grupos durante a infecção, analisamos a variação percentual individual do peso. Analisamos a evolução do peso até o vigésimo segundo dia de infecção para o Balb/C e décimo quarto dia para o CBA, pois nestes dias ainda restava um número adequado de animais vivos para propiciar a comparação. Durante a infecção pelo *P. berghei* ANKA,

independente do tratamento utilizado para os dois modelos experimentais, observou-se perda progressiva de peso.

O tratamento com talidomida dos camundongos Balb/C infectados reduziu a perda de peso a partir do décimo oitavo dia de infecção em relação aos não tratados. Na malária, a caquexia é resultante da ação de citocinas como FNT, IL-1, IL-6 e IL-12 (Yoshimoto e cols, 1998; Tracey, 2002; Onwuamaegbu e cols, 2004). O estímulo, principalmente inflamatório, aumenta a taxa metabólica basal e o consumo das reservas lipídicas e protéicas, promovendo perda acentuada do peso. O aumento da taxa metabólica basal durante a doença gera a necessidade de aumentar o aporte nutricional para suprir o novo requerimento energético. Por outro lado, o próprio FNT também causa anorexia (Tracey, 2002), aumentando, assim, a perda de peso. É provável que a diminuição da perda de peso nos animais tratados com talidomida tenha ocorrido pela modulação da resposta inflamatória, pela inibição do FNT diretamente, aumentando a degradação do ARNm desta citocina (Moreira e cols, 1993; Sampaio e cols, 1991), como, indiretamente, por meio da inibição das cinases (IKKs) responsáveis pela ativação da via do NFκB (Keifer e cols, 2001; Leleu e cols, 2005; Teo e cols, 2005). Como o NFκB é responsável pela transcrição não somente do FNT, mas também de outros mediadores inflamatórios, como a IL-1, é possível que a talidomida, ao inibir as IKKs, também iniba a transcrição destas outras moléculas. De fato, o tratamento com talidomida aumentou o ganho de peso em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana com ou sem tuberculose, cuja fisiopatogenia também depende do FNT (Kaplan e cols, 2000).

Os animais tratados apenas com sacarose apresentaram maior perda de peso até o décimo primeiro dia da infecção em relação aos animais que receberam água destilada, porém, a partir do décimo quarto dia, os animais que receberam a sacarose perderam menos peso do que os animais que receberam apenas água. Entretanto, não está esclarecido por que a talidomida diluída em sacarose aumentou a perda de peso dos camundongos a partir do décimo quarto dia de infecção em relação aos animais tratados apenas com sacarose.

Para os camundongos CBA, o tratamento com talidomida em sacarose não influenciou a perda de peso.

Os camundongos Balb/C apresentaram maior perda de peso que os CBA a partir do sexto dia de infecção, independente do tratamento. Diferentemente de nossos resultados, Pierrot e cols (2003) não observaram diferença na variação de peso entre os camundongos Balb/C e C57BL/6, este último susceptível à malária cerebral, infectados por *P. berghei* ANKA. Deve ser observado que esses autores utilizaram animais com 16 semanas de idade, enquanto que em nosso experimento os animais variavam entre 8 e 12 semanas de idade.

Avaliamos a influência da talidomida sobre o hematócrito dos camundongos Balb/C e CBA com o objetivo de verificar a interferência desta droga na progressão da anemia. A infecção malárica reduziu o hematócrito em todos os grupos, independentemente do tratamento, nos dois modelos estudados.

Os tratamentos com talidomida, com sacarose ou com talidomida e sacarose combinadas dos camundongos Balb/C agravaram a anemia em

relação aos animais tratados apenas com água, a partir do vigésimo primeiro dia de infecção. Tem sido observado que na anemia da malária murina, a diminuição da celularidade da medula óssea foi superior a 75% (Weiss e cols, 1989), refletindo uma diminuição na população de progenitores eritróides proporcional à severidade da infecção (Silverman e cols, 1987). Foi sugerido que citocinas como o FNT (Miller e cols, 1989) e o INF- $\gamma$  (Yap e Stevenson, 1994) fossem responsáveis pela anemia, porém a neutralização destas citocinas com anticorpos monoclonais não modificou a população dos progenitores eritróides (Yap e Stevenson, 1994). Por outro lado, o FNT diminui, indiretamente, a produção da eritropoetina, por inibir a produção de IL-10, além de estimular a eritrofagocitose pelos macrófagos (Roth e Herman, 1979; Miller e cols, 1989; Chang e Stevenson, 2004). Portanto, esperava-se que, com a inibição do FNT pela talidomida, houvesse alteração na evolução da anemia. Ao contrário, a partir do vigésimo primeiro dia, houve agravamento da anemia pela talidomida. Por outro lado, o FNT foi quantificado apenas no oitavo dia de infecção, o que pode não representar a cinética da produção desta citocina durante toda a infecção. A talidomida pode indiretamente estimular a eritropoiese ao diminuir a produção de FNT, aumentar a produção de IL-10 e modular a produção de IL-12. Por outro lado, sugere-se que a produção excessiva de IL-10 interfira com o metabolismo do ferro e que seja responsável pela anemia durante o processo inflamatório crônico (Tilg e cols, 2002). É possível que a imunomodulação causada pela talidomida tenha aumentado a produção de IL-10, agravando a anemia a partir do vigésimo primeiro dia de infecção. Porém, este aumento foi observado apenas ao final da infecção. Ademais, embora os efeitos adversos da talidomida sejam infrequentes e

principalmente relacionados às alterações neurológicas, relata-se que neutropenia e anemia hipocrômica sejam complicações hematológicas raras com o uso da talidomida (Ghobrial e Rajkumar, 2003). Além do mais, o mecanismo de anemia na malária não está completamente elucidado e parece envolver muitos outros fatores.

A sacarose agravou a anemia ao final da infecção nos camundongos Balb/C. É provável que tal fato tenha ocorrido devido ao aumento da resposta inflamatória e do estresse oxidativo somado ao aumento discreto da parasitemia observado nos animais tratados com sacarose. Entretanto, a anemia pela ruptura dos eritrócitos infectados pós-esquizogonia não é o único mecanismo relacionado à anemia na malária (Evans e cols, 2006).

Os camundongos Balb/C apresentaram anemia mais grave e precoce em relação aos camundongos CBA independente do tratamento, acentuando-se a partir do nono dia de infecção, semelhante ao observado por Roth e Herman (1979), que relataram que o Balb/C apresenta anemia progressiva iniciando em torno do sétimo dia de infecção com posterior reticulocitose. Os camundongos CBA apresentaram anemia mais discreta, o que é compatível ao observado por outros autores, uma vez que camundongos CBA infectados por *P. berghei* ANKA morrem por malária cerebral com baixa parasitemia e anemia (Grau e cols, 1987; Carvalho e cols, 2000).

O macrófago é uma célula fagocitária especializada importante na defesa contra o plasmódio (Ockenhouse e Shear, 1984). Os fagócitos expressam uma variedade de receptores que participam do reconhecimento e internalização dos patógenos. A resposta imunitária inata pode se dar por meio

de receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos (rPMP), tais como o receptor para manose, para lecitina, para integrinas e TOLL, e por meio de proteínas do complemento presentes no soro, por mecanismos dependentes ou independentes de anticorpos (Underhill, 2002).

No nosso modelo, para estudar a função dos fagócitos, utilizamos os macrófagos peritoneais, pois não são células fixas e podem participar da defesa em todo o organismo. Portanto, é provável que estas células representem a população de fagócitos envolvidos na defesa e na imunopatogenia antiparasitária. A fagocitose pelos macrófagos peritoneais foi testada na presença de soro fetal bovino, para avaliar a fagocitose por meio de receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos (rPMP), e na presença de soro fresco de camundongo, para avaliar a fagocitose por meio de receptores para as moléculas do sistema complemento ou receptores para a fração Fc das imunoglobulinas. As opsoninas que estão presentes no soro fresco aderem-se às leveduras e ao mesmo tempo ligam-se aos receptores presentes na superfície dos macrófagos, facilitando a fagocitose.

A talidomida não influenciou a fagocitose pelos macrófagos pelos rPMP nos dois modelos de camundongos estudados. Quando comparamos os dois modelos animais, os camundongos Balb/C, independente da infecção ou do tratamento, apresentaram maior capacidade fagocitária por meio dos rPMP e pelos receptores para opsoninas que os camundongos CBA. O aumento da fagocitose pelos rPMP foi devido ao maior envolvimento de macrófagos na fagocitose, e o aumento da capacidade fagocitária por meio dos receptores para opsoninas foi devido tanto ao envolvimento de macrófagos na fagocitose quanto pelo número de leveduras ingeridas/aderidas. A desigualdade na



capacidade fagocitária entre os dois modelos pode, em parte, ser explicada pelo fato de que tem sido mostrado que a expressão dos rPMP ocorre de forma diferenciada de acordo com o tipo de célula, estímulos, tecidos e modelos experimentais animais estudados (Loose, 1984; Nebl, 2005). Ademais, o menor envolvimento de macrófagos na fagocitose nos camundongos CBA pode ter ocorrido pela diferença na expressão de moléculas quimiotáticas, pois tem sido observada expressão diferenciada de RANTES nas membranas celulares dos macrófagos em diferentes cepas de camundongos (Hanum e cols, 2003).

Entre os mecanismos microbicidas dos fagócitos encontram-se os radicais de oxigênio e nitrogênio, moléculas que podem participar tanto da imunopatogenia quanto da proteção na malária (Kremsner e cols, 2000; Gyan e cols, 2002; Pabón e cols, 2003). Em nosso estudo, nem o tratamento com talidomida nem a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA modificaram a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos dos camundongos Balb/C, pelo menos no oitavo dia de infecção. Borges (2006) também não observou alteração da produção deste radical na infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos Balb/C. Tem sido sugerido que este radical livre participa dos mecanismos imunopatogênicos da forma cerebral. Pelo fato destes animais não desenvolverem a forma grave cerebral, é possível que a falta de produção de radicais de oxigênio seja um fator protetor para o desenvolvimento da forma grave nestes animais. Entretanto no modelo CBA, Muniz-Junqueira e cols (2005) demonstraram que o tratamento com talidomida de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA aumentou discretamente a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e relacionaram este efeito imunomodulatório da talidomida a mecanismos de proteção. Em nosso estudo, não conseguimos reproduzir este efeito da

talidomida em camundongos CBA infectados com a mesma cepa, talvez devido ao reduzido número de animais estudados. Contudo, não detectamos diferença na produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais ao compararmos os dois modelos.

Têm sido controversos os resultados de produção de peróxido de hidrogênio na malária, podendo estar tanto aumentada quanto diminuída de acordo com a combinação do modelo experimental e do plasmódio utilizado, além do período da infecção onde foi avaliada sua produção e do tipo de macrófago envolvido, uma vez que esta parece ser cíclica (Brinkmann e cols, 1984; Wozencraft e cols, 1984; Stevenson e cols, 1992). Brinkmann e cols (1984) demonstraram que camundongos C57BL/6 infectados pelo *P. yoelli* produzem mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que quando infectados por *P. berghei* ANKA e que, quando estes camundongos são infectados pelo *P. chabaudi*, produzem grande quantidade deste radical até o sétimo dia, reduzindo para valores normais no décimo dia (Stevenson e cols, 1992).

Tem-se apontado o óxido nítrico (ON) como uma molécula crucial na patogênese da malária (Clark e Cowden, 2003), porém seu mecanismo de ação durante a infecção é controverso (Sobolewski e cols, 2005). Em nossos experimentos, o tratamento com talidomida dos camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA modulou negativamente a produção biológica de óxido nítrico e a infecção aumentou a produção desta molécula, pelo menos no oitavo dia. Lopez-Talavera e cols (1996) demonstraram que a talidomida diminui a síntese de óxido nítrico indiretamente por inibir o FNT durante a síndrome circulatória hiperdinâmica induzida em ratos, e diretamente, por inibir a sintase do óxido nítrico. Também observamos que os camundongos Balb/C

infectados apresentaram maior produção de ON que os camundongos CBA. Contudo, no modelo CBA, a talidomida causou discreta redução biológica na produção de ON pelos macrófagos peritoneais no oitavo dia de infecção. Diferentemente, Muniz-Junqueira e cols (2005) encontraram aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA tratados com talidomida, associado com melhor sobrevivência, sugerindo que o aumento do óxido nítrico pela talidomida teve efeito protetor. Tal diferença em relação aos nossos dados possivelmente se deveu ao número muito limitado de animais usados no nosso experimento. Por outro lado, ao contrário do que foi observado nos camundongos Balb/C, a estimulação com INF- $\gamma$ , LPS ou INF- $\gamma$  e LPS concomitantemente foram capazes de aumentar a produção de ON pelos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA. Segundo Stevenson e cols (1995) e Jacobs e cols (1996), a produção de óxido nítrico pode ser regulada tanto pelo INF- $\gamma$  quanto pelo FNT. Não está esclarecido por que estes estímulos não induziram a produção de óxido nítrico pelos macrófagos dos camundongos Balb/C. É provável que os modelos animais utilizados respondam diferentemente aos mesmos estímulos e que o ON não seja estimulado pelo interferon gama, mas sim pelo FNT via iNOS, que é expressa na membrana dos macrófagos de acordo com o modelo murino (Nahrevanian e Dascombe, 2002). Outra hipótese é que, assim como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a produção de ON é dependente do modelo experimental, do tecido onde está sendo produzido, do dia de infecção, da parasitemia e do plasmódio utilizado, o que também explica a maior produção de óxido nítrico pelos camundongos Balb/C em comparação aos CBA na infecção.

Nossos dados mostraram que os macrófagos dos camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA aumentaram tanto a produção sérica de FNT quanto a produção em cultura pelos macrófagos peritoneais, e que o tratamento com talidomida diminuiu esta produção. Hanum e cols (2003) demonstraram níveis aumentados de FNT nos sobrenadantes de culturas de células esplênicas de camundongos Balb/C, a partir do oitavo dia de infecção pelo *P. berghei* ANKA, enquanto outros autores relataram níveis séricos elevados de FNT nas formas graves da malária (Kwiatkowski e cols, 1990; Grau e Lou, 1994). Provavelmente, a diminuição da produção do FNT se deveu ao aumento da taxa de degradação do ARNm do FNT pela talidomida (Moreira e cols, 1993). Este efeito da talidomida já foi demonstrado em monócitos humanos tanto *in vitro* (Sampaio e cols, 1991) quanto *in vivo* (Sampaio e cols, 1993). Portanto, é provável que o FNT no modelo Balb/C, esteja envolvido com a proteção contra a infecção, contribuindo para maior sobrevivência dos animais devido ao seu efeito antiparasitário (Muniz-Junqueira e cols, 2001), sendo que a sua inibição não foi prejudicial aos animais, uma vez que não houve alteração da evolução da doença nem modificação da sobrevivência pelo tratamento com a talidomida.

Os camundongos CBA infectados pelo *P. berghei* ANKA apresentaram discreto aumento biológico da produção de FNT na cultura de sobrenadante de macrófagos peritoneais apenas após estímulo com LPS, e o tratamento com talidomida reduziu esta produção. Entretanto, detectamos aumento dos níveis séricos do FNT durante a infecção sendo que o tratamento com talidomida não alterou esta produção. Os efeitos observados nos camundongos Balb/C, como aumento da produção de FNT na cultura de macrófagos e no soro e a inibição

desta produção pela talidomida, não foram observados nos camundongos CBA, possivelmente pelo número limitado de animais utilizados no experimento. Outra possibilidade é que o oitavo dia de infecção pode não ser para este modelo, o dia mais representativo da produção de FNT. De fato, Hanum e cols (2003) detectaram produção de FNT no quarto dia de infecção em todas as amostras de camundongos C57BL/6, modelo susceptível à malária cerebral. Contudo, apenas a metade dos animais apresentou produção detectável de FNT nos sexto e sétimo dias de infecção. De fato, detectamos, no oitavo dia de infecção, maiores quantidades de FNT no sobrenadante das culturas de macrófagos dos camundongos Balb/C do que dos CBA.

Observamos que a produção de FNT na cultura de macrófagos para os dois modelos foi maior que a detectada no soro, sendo que no soro as concentrações de FNT foram similares para os dois modelos estudados. Embora alguns autores demonstrem níveis plasmáticos aumentados de FNT em camundongos (Grau e cols, 1987) e humanos (Grau e cols, 1989; Kwiatkowski e cols, 1990) com malária cerebral, Carvalho e cols (2000) não demonstraram correlação entre o nível plasmático de FNT e os sinais clínicos ou as alterações histopatológicas nos camundongos CBA. Os níveis locais de citocinas, associados com alterações como congestão vascular, seriam mais importantes na determinação da progressão da infecção do que os níveis sistêmicos (Jennings e cols, 1998). No nosso estudo, observamos níveis maiores de produção de FNT na cultura de macrófagos dos camundongos Balb/C do que dos CBA. Uma possibilidade para explicar a ausência de lesão cerebral e níveis elevados de FNT no modelo Balb/C estaria relacionada com a expressão ou o tipo de resposta dos receptores para esta citocina. De fato,

Piguet e cols (2002) sugerem que a evolução da malária cerebral depende da produção de FNT, mas também do tipo de receptor ao qual se ligará, sendo que camundongos C57BL/6 nocauteados para o R2FNT eram resistentes à forma grave da doença. Da mesma forma, Lucas e cols (1997) observaram que nos cérebros de camundongos CBA havia expressão aumentada de R2FNT, enquanto que em Balb/C a expressão de ambos receptores era normal. É possível que, em nosso trabalho, apesar dos camundongos Balb/C terem apresentado maior produção de FNT que os camundongos CBA, aqueles não desenvolvam a forma cerebral da doença pela expressão diferenciada de receptores para o FNT, inclusive no endotélio vascular, e os camundongos CBA, mesmo com menor produção de FNT, podem apresentar maior responsividade a esta molécula.

Pelo conjunto de nossas observações nos camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA, a talidomida não modificou a curva de sobrevivência, diminuiu a perda de peso, retardou a elevação da parasitemia em nove dias, entretanto, agravou a anemia a partir do vigésimo primeiro dia de infecção em relação aos animais tratados apenas com água destilada. Nos animais tratados apenas com a sacarose, o açúcar antecipou em um dia o início da morte e diminuiu em nove dias o tempo de vida, aumentou a parasitemia, agravou a anemia a partir do vigésimo primeiro dia e aumentou a perda de peso no início da infecção, porém reduziu a perda de peso posteriormente, a partir do décimo quarto dia em relação aos animais tratados apenas com água destilada. A diluição da talidomida na solução de sacarose não modificou a curva de sobrevivência nem a perda de peso, porém agravou a evolução da anemia a partir do vigésimo primeiro dia da infecção e a elevação

da parasitemia no quarto dia de infecção em relação aos animais tratados com água destilada. A talidomida não alterou a capacidade fagocitária e a produção de peróxido de hidrogênio; modulou negativamente a produção de óxido nítrico, provavelmente por ter diminuído a produção de FNT tanto na cultura de macrófagos quanto no soro. Nos camundongos CBA infectados pelo *P. berghei* ANKA, o tratamento com talidomida não modificou a curva de sobrevivência dos animais, a perda de peso, a parasitemia, a anemia, a capacidade fagocitária e a produção de peróxido de hidrogênio, porém modulou negativamente a produção de óxido nítrico.

Nossos dados analisaram, pela primeira vez, a influência da talidomida sobre a evolução da infecção malárica em modelo não susceptível à forma cerebral.

Observamos que os dois modelos de camundongos apresentaram respostas diferentes do sistema imunitário ao estímulo pelo parasita e à influência da talidomida. Isto ocorre provavelmente pelas características genéticas diferentes de cada modelo de camundongo, e determinarão como consequência o tipo de evolução da doença.

Nossos dados sugerem que a administração isolada de sacarose por via oral e venosa deve ser mais bem avaliada, desde que na vigência do tratamento das formas graves da malária estes pacientes estarão sendo submetidos à administração endovenosa de solução glicosada, sendo passíveis, portanto, de sofrerem influências deletérias do açúcar durante a infecção malárica.

O principal objetivo deste trabalho foi verificar se a talidomida utilizada num modelo que não evoluiria para a forma cerebral poderia aumentar a

gravidade da malária, desde que esta droga modula o sistema imunitário. Mostramos que a talidomida, embora tenha agravado a anemia no final da infecção, não alterou a sobrevivência dos animais e ainda melhorou a parasitemia e a perda de peso durante a infecção, e os macrófagos dos animais tratados apresentaram uma produção de óxido nítrico mais adequada. Isto sugere que a talidomida provavelmente não interferirá na evolução da doença em indivíduos que não desenvolveriam a forma grave da malária. Portanto, a utilização da talidomida como terapia adjuvante aos anti-plasmodiais, antes das manifestações clínicas de gravidade da doença, deve ser avaliada em seres humanos, exceto mulheres, com o objetivo de diminuir a grande morbidade e mortalidade da malária.



**CONCLUSÕES**

1. O tratamento com talidomida com adição ou não de sacarose, iniciado a partir do terceiro dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, não modificou a sobrevivência dos camundongos Balb/C em relação aos animais que receberam apenas água destilada. Os animais tratados apenas com sacarose começaram a morrer mais precocemente e houve diminuição da sobrevivência neste grupo. A associação da talidomida com a sacarose retardou o início da morte e aumentou a sobrevivência dos camundongos em relação aos animais tratados apenas com o açúcar, mas não modificou a sobrevivência em relação aos animais tratados com água destilada. Nos camundongos CBA, o tratamento com talidomida e sacarose não modificou a sobrevivência dos animais em relação aos tratados com sacarose.

2. Todos os animais perderam peso durante a infecção, independente do tratamento. Os animais tratados com talidomida ou sacarose apresentaram menor perda de peso ao final da infecção em relação aos tratados com água destilada. O tratamento com talidomida diluída em sacarose não modificou a perda de peso dos camundongos Balb/C em relação aos animais que receberam água destilada. Porém, os animais tratados com talidomida diluída em sacarose apresentaram maior perda de peso até o final da infecção em relação aos tratados, isoladamente, com sacarose ou com talidomida. Nos camundongos CBA, o tratamento com talidomida em sacarose não modificou a perda de peso dos animais em relação aos tratados apenas com sacarose.

3. Os camundongos Balb/C infectados por *P. berghei* ANKA e tratados com talidomida apresentaram retardo na evolução da parasitemia até o quarto dia

em relação aos animais tratados apenas com água destilada. Os animais tratados apenas com sacarose apresentaram maior parasitemia no quarto dia, em relação aos animais tratados apenas com talidomida ou água destilada. Os animais tratados com talidomida em sacarose apresentaram maior parasitemia no quarto dia de infecção, em relação aos tratados somente com talidomida ou água destilada, e retardo na evolução da parasitemia a partir do vigésimo primeiro dia, em relação aos animais tratados apenas com sacarose. Para os camundongos CBA, o tratamento com talidomida em sacarose não modificou a evolução da parasitemia em relação aos tratados apenas com sacarose. Os camundongos Balb/C morreram com parasitemia mais elevada do que os camundongos CBA.

4. Todos os animais apresentaram anemia durante a infecção, independente do tratamento utilizado. Os camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados com talidomida, talidomida diluída em sacarose ou sacarose apresentaram maior redução do hematócrito em relação aos tratados com água destilada a partir do vigésimo primeiro dia. Contudo, o tratamento com talidomida em sacarose não modificou a evolução do hematócrito em relação aos animais tratados apenas com sacarose. Para os camundongos CBA, o tratamento com talidomida em sacarose não modificou a diminuição do hematócrito em relação aos tratados apenas com sacarose. Os camundongos CBA morreram com hematócrito elevado, provavelmente por malária cerebral, enquanto que os camundongos Balb/C morreram mais tardiamente com hematócrito muito mais baixo, possivelmente pela anemia.

5. O tratamento com talidomida, iniciado a partir do terceiro dia de infecção pelo *P. berghei* ANKA, não modificou a capacidade fagocitária dos macrófagos dos camundongos Balb/C e CBA pelos receptores para padrões moleculares de patógenos ou pelas opsoninas presentes no soro fresco.
6. O tratamento com talidomida não modificou a produção de fator de necrose tumoral dos camundongos Balb/C e CBA no sobrenadante da cultura de macrófagos e no soro.
7. Observamos maiores concentrações de FNT no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais do que no sangue dos camundongos Balb/C e CBA.
8. O tratamento com talidomida não modificou a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C e CBA.
9. O tratamento com talidomida modulou negativamente a produção de óxido nítrico estimulada por LPS pelos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C, aumentada durante a infecção.
10. Nossos dados sugerem que fatores genéticos estão envolvidos na imunopatologia da malária nestes dois modelos estudados, determinando a evolução da doença para a forma grave. Sugerem também que a sacarose sozinha piora a evolução da doença no modelo não susceptível à forma cerebral, pois diminuiu a sobrevida, aumentou a parasitemia e a anemia. Nossos dados sugerem que a talidomida modulou a diminuição da perda de

peso no final da infecção e retardou a evolução inicial da parasitemia. Não modificou a capacidade fagocitária e a produção de peróxido de hidrogênio. E modulou negativamente os níveis de FNT e óxido nítrico aumentados pela infecção. Estes fatos sugerem que a talidomida provavelmente não prejudicará a resposta do sistema imunitário dos indivíduos que não evoluíram para a forma grave da doença. Nossos dados sugerem que a talidomida deve ser avaliada em seres humanos, exceto em mulheres, como terapia adjuvante às drogas anti-plasmodiais, com o intuito de reduzir a morbi-mortalidade das formas graves da doença.

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

Aikawa M, Iseki M, Barnwell JW, Taylor D, Oo MM, Howard RJ. The pathology of human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43: 30-37.

Aljada A, Friedman J, Ghanim H, Mohanty P, Hofmeyer D, Chaudhuri A, Dandona P. Glucose ingestion induces an increase in intranuclear nuclear factor  $\kappa$ B, a fall in cellular inhibitor  $\kappa$ B, and an increase in tumor necrosis factor  $\alpha$  messenger RNA by mononuclear cells in healthy human subjects. *Metab Clinic and Experim* 2006; 55:1177– 1185.

Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, Amelle DR, Hollis D, Macdonald MI, Granger DL. 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.

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

Arrieta O, Ortiz-Reyes A, Rembao D, Calvillo M, Rivera E, Sotelo J. Protective effect of pentoxifyline plus thalidomide against septic shock in mice. *Inf J Exp Path* 1999; 80: 11-16.

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

Bate CAW, Taverne J, Playfair JHL. Malarial parasites induce tumour necrosis factor production by macrophages. *Immunology* 1988; 64: 227-31.

Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 64-76.

Borges TS. Influência da pentoxifilina sobre a infecção murina por *Plasmodium berghei* ANKA em modelos susceptíveis ou não à malária cerebral. *Tese de Mestrado*. Brasília (DF). Univ Brasília - UNB 2006.

Bottex-Gauthier C, Pollet S, Favier A, Vidal DR. Les facteurs de transcription Rel/ NF $\kappa$ B : rôle complexe dans les régulations cellulaires. *Pathol Biol* 2002; 50 : 204-211.

Brandi MCAC. Padronização de um método de obtenção de fagócitos do sangue periférico para avaliação funcional [Tese de Mestrado]. Brasília (DF). Univ Brasília; 1993.

---

A citação bibliográfica no texto seguiu o sistema de Harvard e a estruturação das referências na listagem da bibliografia seguiu o estilo de Vancouver. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals . *BMJ* 1991; 302: 338-341. Halsey MJ. References. In: Hall GM, ed. How to write a paper. London *BMJ*; 1994: 49-50.

Breman JG, Alilio MS, Mills A. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71 (2): 1-15.

Brinkmann V, Kaufmann SH, Simon MM, Fischer H. Role of macrophages in malaria: O<sub>2</sub> metabolite production and phagocytosis by splenic macrophages during lethal *Plasmodium berghei* and self-limiting *Plasmodium yoelii* infection in mice. *Infect Immun* 1984; 44: 743-746.

Candeias LP, Patel KB, Stratford MRL, Wardman P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Lett* 1993; 333: 151-153.

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

Chang KH, Stevenson MM. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Inter J Parasitol* 2004; 34: 1501-1516.

Chen L, Sendo F. Cytokine and chemokine mRNA expression in neutrophils from CBA/NSIc mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA that induces experimental cerebral malaria. *Parasitol Int* 2001; 50: 139-143.

Clark IA, Hunt NH. Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasites death in malaria. *Infect Immun* 1983; 39: 1-6.

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

Clark IA, al Yaman FM, Jacobson LS. The biological basis of malarial disease. *Int J Parasitol* 1997; 27: 1237-1249.

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

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

Coelho VNPD. Influência do tratamento, in vitro, de fagócitos humanos e murinos com antimoniato de meglumina sobre a fagocitose, produção de radicais de oxigênio e nitrogênio e fator de necrose tumoral- $\alpha$ . *Tese de Mestrado*. Brasília (DF). Univ Brasília - UNB 2003.

Combes, V, De Souza, JB, Renia L, Hunt NH, Grau, GE. Cerebral malaria: Which parasite? Which model? *Drug Discovery Today: Disease Models* 2005; 1(2): 141-147.



Cooke BM, Mohandas N, Cowman AF, Coppel RL. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. *Vet Parasitol* 2005; 132: 273-295.

Corral L, Kaplan G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Ann Rheu. Di.* 1999; 58: 1107-1113.

Davey PP, Ashrafian H. New therapies for heart failure: is thalidomide the answer?. *QJM* 2000; 93: 305-311.

Dib SA. Resistência à insulina e síndrome metabólica no diabetes melito do tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50(2): 250-263.

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

Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol Today* 2000; 16; 228-232.

Ekvall H, Arese P, Turrini F, Ayi K, Mannu F, Premji Z, Bjorkman A. Acute haemolysis in childhood falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95(6): 611-617.

English M, Sauerwein R, Waruiru C, Mosobo M, Obiero J, Lowe B, Marsh K. Acidosis in severe childhood malaria. *Q J Med* 1997; 90: 263-270.

Evans KJ, Hansen DSD, van Rooijen N, Buckingham LA, Schofield L. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* 2006; 107: 1192-1199.

Franks ME, Macpherson GR, Figg WD. Thalidomide. *Lancet* 2004; 363: 1802-1811.

Favre N, Ryffel B, Rudin W. The development of murine cerebral malaria does not require nitric oxide production. *Parasitology* 1999; 118: 135-138.

Fernandez V, Treutiger CJ, Nash GB, Wahlgren M. Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 1998; 66: 2969-2975.

Ghobrial I, Rajkumar V. Management of thalidomide toxicity. *J Support Oncol* 2003; 1: 194-205.

Gimenez E, Lagerie SB, Fernandez C, Pino P, Mazier D. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1623-1635.

Goetz FW, Planasb JV, MacKenzie S. Tumor necrosis factors. *Develop Compar Immunology* 2004; 28: 487-497.

Golenser D, Kamyl M, Tsafack A, Marva E, Cohen A, Kitrossky N, Chevion M. Correlation between destruction of malarial parasites by polymorphonuclear leucocytes and oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 1992; 17: 249-262.

Grau GE, Bieler G, Pointaire P, de Kossodo S, Tacchini-Cotier F, Vassalli P, Piguet PF, Lambert PH. Significance of cytokine production and adhesion molecules in malarial immunopathology. *Immunol Lett* 1990; 25: 189-194.

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, Lou JN. TNF-induced microvascular pathology in the Th1-mediated lesions of mouse cerebral malaria—possible new mechanisms. In S. Romagnani, Del Prete G, Abbas AK. Cytokines: basic principles and clinical applications Ares-Serono Symposia, Rome, Italy. 1994; 265-299.

Grau GE, Tacchini-Cottier F, Vesin C, Milon G, Lou J, Piguet PF, Juillard P. 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, Wirimi JJ, Vassali P, Hommel M, Lambert PH. 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.

Greve B, Lehman LG, Lell B, Luckner D, Schmidt-Ott R, Kremsner PG. High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect Dis* 1999; 179: 1584-1586.

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

Hanum PS, Hayano M, Kojima S. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. *Int Immunol* 2003; 15: 633-640.

Haslett PA, Corral LG, Albert M, Kaplan G. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J Exp Med* 1998; 187: 1885–1892.

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.

Holder AA. Malaria vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 99: 1167-1169.

Hviid L, Theander TG, Elhassan IM, Jensen JB. Increased plasma levels of soluble ICAM-1 and ELAM-1 (E-selectin) during acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol Lett* 1993; 36: 51-58.

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

Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. *In vivo* regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria mice. *Infect Immun* 1996; 64: 44-49.

Jacobson JM, Greenspan JS, Spritzler J, Ketter N, Fahey JL, Jackson JB, Fox L, Chernoff M, Wu Aw, Macphail *et al.* Thalidomide for the treatment of oral aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 1997; 336: 1487-1493.

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

Kaplan G, Thomas S, Fierer DS. Thalidomide for the treatment of AIDS-associated wasting. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1345-1355.

Karrow NA, Mccay MJA, Brown RD, Musgrove DL, Pettit DA, Munson AE, Germolec DR, White KLJ. Thalidomide stimulates splenic IgM antibody response and cytotoxic T lymphocyte activity and alters leucocyte subpopulation numbers in female B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 165: 237-244.

Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin AS Jr. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *J Biol Chem* 2001; 276: 22382-22387.

Kirk K, Homer HA, Kirk J. Glucose uptake in *Plasmodium falciparum* -infected erythrocytes is an equilibrative not an active process. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1996; 82:195-205.

Klebanoff SJ. Oxygen metabolites from phagocytes. In: Gollin JI, Gopdstein IM, Snyderman R, editors. *Inflammations: Basic principles and clinical correlates*. 2th ed. *New York: Raven press*; 1992. P: 541-587.

Kremsner PG, Grundmann H, neifer S, Sliwa K, Sahlmüller G, Hegenscheid B, Bienzle U. Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. *J Infect Dis* 1991; 164: 605-606.

Kremsner PG, Greve B, Lell B, Luckner D, Schmid D. Malaria anaemia in African children associated with high oxygen-radical production. *The Lancet* 2000; 335: 40-41.

Lamb TJ, Brown, DE, Potocnik AJ, Langhorne J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Rev Mol Med* 2006; 8(6): 1-22.

Leleu X, Micol JB, Guieze R, Berthon C, Kuhnovsky F, Terriou L, Moreau AS, Yakoub-Agha I, Bauters F, Facon T. Thalidomide: mécanismes d'action et indications en hematology. *La Revue de Médecine Interne* 2005; 26: 119-127.

Li X, Stark GR. NF $\kappa$ B-dependent signaling pathways. *Exp. Hematology* 2002; 30: 285-296.

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

Loose LD. Characterization of macrophage dysfunction in rodent malaria. *J Leukoc Biol* 1984; 36: 703-718.

Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski, J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$ , decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1996; 23: 1616-1621.

Lou J, Gasche Y, Zheng L, Critico B, Monso-Hinard C, Juillard P, Morel P, Buurman WA, Grau GE. Differential reactivity of brain microvascular endothelial cells to TNF reflects the genetic susceptibility to cerebral malaria. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3989-4000.

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

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

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

Marriot JB, Muller G, Dalgleish AG. Thalidomide as an emerging immunotherapeutic agent. *Immunol Today* 1999; 167-169.

Marsh K, Forster D, Wariuru C, Mwangi I, Winstanley M, Marsh V, Newton C, Winstanley P, Warn P, Peshu N, Pasvol G, Snow R, 1995. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med* 1995; 332: 1399–1404.

Matic M, Simon SR. Tumor necrosis factor release from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes: lipopolysaccharide tolerance in vitro. *Cytokine* 1991; 3: 576-583.

Matthews SJ, Mccoy C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses, *Clinical therapeutics* 2003; 23: 334-395.

McHugh S, Rifkin IR, Deighton J, Wilson AB, Lachmann PJ, Lockwood CM. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen stimulated human peripheral blood mononuclear cell structures. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 160–167.

Meuwissen IH, Ponnundurai T. Biology and biochemistry of sexual and sporogonic stages of *Plasmodium falciparum*: a review. *Bio Cell* 1988; 64: 245-249.

Miller KL, Silverman PH, Kullgren B, Mahlmann LJ. Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun* 1989; 57: 1542-1546.

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

Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2970-3.

Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor- $\alpha$  by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993; 177: 1675-1680.

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: 128-38.

Muniz-Junqueira MI. Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. *Curr Clin Pharmacol* 2006 (In Press).

Nahrevanian H, Dascombe MJ. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in target organs of lethal and non-lethal strains of murine malaria. *Parasit Immunol* 2002; 24: 471-478.

Neame KD, Homewood CA. Alterations in the permeability of mouse erythrocytes infected with malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Int. J. Parasitol.* 1975; 5: 537-540.

Nebi T, De Veer MJ, Schofield L. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology* 2005; 130 (Suppl 1): S45-S62.

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

Newbold C, Warn P, Black G, Berendt A, Craig A, Snow B, Msobo M, Peshu N, Marsh K. Receptor specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57: 389-398.

Newton CRJC, Taylor TE, Whitten RO. Pathophysiology of fatal *falciparum* malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 673-683.

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

Onwuamaegbu ME, Henein M, Coats AJ. Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice. *Postgrad. Med. J.* 2004; 80:642-649.

Otterlei M, Ostgaard K, Skjåk-Braek G, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Espevik T. Induction of cytokine from human monocytes stimulated with alginate. *J Immunother* 1991; 10: 286-291.

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

Payvandi, F. *et al.* Immunomodulatory drugs (IMiDs) inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and LPS stimulated PBMC in partially IL-10-dependent manner. *Cell Immunol* 2004; 230: 81-88.

Penet MF, Viola A, Confort-Gouny S, Le Fur Y, Duhamel G, Kober F, Ibarrola D, Izquierdo M, Coltel N, Gharib B, Grau GE, Cozzone PJ. Imaging experimental cerebral malaria *in vivo*: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci* 2005; 25: 7352-7358.

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(2):211-26.

Pierrot C, Adam E, Lafitte S, Godin C, Dive D, Capron M, Khalife J. Age-related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats. *Exp Parasit* 2003; 104: 81–85.

Piguet PF, Kan CD, Vesin C. Role of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in cerebral malaria in mice. *Lab Invest* 2002; 9: 1155-1166.

Plebanski M, Hill AVS. The immunology of malaria infection. *Curr Opin Immun* 2000; 12: 437-441.

Raje N, Anderson K. Thalidomide a revival story. *N Engl J Med* 1999; 18: 1606-1608.

Raje N, Anderson K. Thalidomide and immunomodulatory drugs as cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2002; 14: 635–640.

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 Int* 1998; 47 (Suppl): 346.

Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Brit Med Bull* 1993; 49: 700-718.

Richardson P, Hideshima T, Anderson K. Thalidomide in multiple myeloma. *Biomed Pharamcother* 2002; 56: 115-128.

Rilley EM. Is T cell priming required for initiation of pathology in malaria infections? *Immunol Today* 1999; 20: 228-233.

Roth RL, Herman R. *Plasmodium berghei*: correlation of *in vitro* erythrophagocytosis with the dynamics of early-onset anemia and reticulocytosis in mice. *Exp Parasitol* 1979; 47: 169-179.

Roth EJ, Joulin V, Miwa S, Yoshida A, Akatsuka J, Cohen-Solal M, Rosa R. The Use of Euzymopathic Human Red Cells in the Study of Malarial Parasite Glucose Metabolism. *Blood* 1988; 71(5):1408-1413.

Rowland TL, McHugh SM, Deighton J, Dearman RJ, Ewan PW, Kimber I. Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology* 1998; 40: 11–20.

Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002; 415: 680-685.

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

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

Sampaio EP, Hernandez MO, Carvalho DS, Sarno EN. Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide analogues inhibit M. leprae-induced TNF-alpha production in vitro. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 13-19.

Schneider J, Bruckmann W, Zwingenberger K. Extravasation of leukocytes assessed by intravital microscopy: effect of thalidomide. *Inflamm Res* 1997; 46: 392-397.

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

Shannon EJ, Sandoval F, Krahenbuhl JL. Hydrolysis of thalidomide abrogates its ability to enhance mononuclear cell synthesis of TNF- $\alpha$ . *Immunopharmacology* 1997; 36: 9-15.

Shaw DR, Griffin Jr FM. Antibody dependent and antibody independent phagocytosis. In: Adams DO, Edelson PJ, Koren H, editors. *Methods for studying mononuclear phagocytes*. New York: Academic Press; 1981. P.511-527.

Sherman IW, Eda S, Winograd E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes Infect* 2003; 5: 897-909.

Silva-Junior JB, A malaria no Brasil. Situação epidemiológica da malária no Brasil. Brasil: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde 2005.

Silverman PH, Schooley JC, Mahlmann LJ. Murine malaria decreases hemopoietic stem cells. *Blood* 1987; 69: 408-413.

Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar *et al*. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999; 341:1565–1571.

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

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



Stevenson MM, Huang DY, Podoba JE, Nowotarski ME. Macrophage activation during *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant C57BL/6 and susceptible A/J mice. *Infect Immun* 1992; 60: 1193-1201.

Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 169-180.

Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF, Sher AIL. IL 12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 1995; 155: 2545-2556.

Tanabe K. Glucose transport in malaria-infected erythrocytes. *Parasitol. Today* 1990; 6: 225-229.

Teo SK, Stirling DI, Zeldis JB. Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product. *Drug Discovery Today* 2005; 10 (2): 107-114.

Taylor-Robinson AW, Smith EC. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunol Letters* 1999; 67: 1-9.

Theander TG. Defence mechanisms and immune evasion in the interplay between the human immune system and *Plasmodium falciparum*. *Dan Med Bull* 1991: 95-106.

Thomas EL. Myeloperoxidase, hydrogenperoxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial compounds in bactericidal action against *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1979; 23: 522-531.

Tilg H, Ulmer H, Kaser A, Weiss G. Role of IL-10 for Induction of Anemia During Inflammation. *The Journal of Immunology* 2002; 169: 2204-2209.

Tosta CE, Wedderburn N. Immune phagocytosis of *Plasmodium yoelii*-infected erythrocytes by macrophages and eosinophils. *Clin Exp Immunol* 1980; 42: 114-120.

Tosta CE. Effects of immune and hyperimmune serum on the dynamics of phagocytosis of *Plasmodium berghei*-infected erythrocytes. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1982; 24: 140-147.

Tosta CE, Ruiz G, Wedderburn N. Effects of lethal and non-lethal malaria on the mononuclear phagocyte system. *Rev Soc Bras Med Trop* 1983; 16: 58-67.

Tracey KJ. Lethal weight loss: the focus shifts to signal transduction. *Sci Stke* 2002; 130: 1-3.

Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukritayakamee S, Nagachinta B. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidences of

widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol* 1994; 145: 1057-1069.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual Rev Immunol* 2002; 20: 825-852.

Verbon A, Juffermans NP, Speelman P, van Deventer SJH, ten Berge IJM, Guchelaar HJ, van der Poll T. A single oral dose of thalidomide enhances the capacity of lymphocytes to secrete gamma interferon in healthy humans. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2286–2290.

Vijaykumar M, Naik RS, Gowda DC. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol-induced TNF-alpha secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 6909-6912.

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

Warrel DA. Pathophysiology of severe falciparum malaria in man. *Parasitology* 1987; 94: 553-576.

Weiss L, Johnson J, Weidanz W. Mechanisms of splenic control of murine malaria: tissue culture studies of the erythropoietic interplay of spleen, bone marrow, and blood in lethal (strain 17XL) *Plasmodium yoelii* malaria in BALB/c mice. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 135-143.

Weiss SJ, King GW, LoBuglio AF. Evidence for hydroxyl radical generation by human monocytes. *J Clin Invest* 1977; 60: 370–373.

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

Wnendt S, Finkam M, Winter W, Ossig J, Raabe G, Zwingenberger K. Enantioselective inhibition of TNF-alpha release by thalidomide and thalidomide-analogues. *Chirality* 1996; 8: 390–396.

Wozencraft AO, Dockrell HM, Teverne J, Targett GAT, Playfair JHL. Killing of human malaria parasites by macrophage secretory products. *Infect Immun* 1984; 43: 664-669.

Yap GS, Stevenson MM. Blood transfusion alters the course and outcome of *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice. *Infect Immun* 1994; 62: 3761-3765.

Yoshimoto T, Takahama Y, Wang CR, Yoneto T, Waki S, Nariuchi H. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. *J Immunol* 1998; 160: 5500-5505.

Zhang G. Tumor necrosis factor family ligand–receptor binding. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14: 154–160.

Zwingenberger K, Wnendt S. Immunomodulation by thalidomide: systematic review of the literature and of unpublished observations. *J Inflamm* 1996; 46: 177-211.

## **ANEXO TABELAS**

**Tabela 01**

Análise comparativa entre as variações percentuais de pesos do vigésimo segundo dia de infecção malárica pelo *Plasmodium berghei* ANKA, nos camundongos Balb/C, para os seguintes tratamentos: 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+T), 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S), solução de sacarose 0,8M (Pb+S) e água destilada (Pb).

Modelo murino	Grupos	Média $\Delta\% \pm DP$	Variação percentual em relação ao peso inicial
Balb/C	Pb	-0,3648 $\pm$ 0,03	31,64
	Pb+T	-0,1145 $\pm$ 0,02	32,55
	Pb+T+S	-0,3308 $\pm$ 0,05	32,17
	Pb+S	-0,1418 $\pm$ 0,06	37,05

$p=0,002$ , Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn para comparação entre os grupos: Pb x Pb+S e Pb x Pb+T ( $p<0,05$ ); Pb x Pb+T+S, Pb+T+S x Pb+S, Pb+T+S x Pb+T e Pb+S x Pb+T ( $p>0,05$ ).

**Tabela 02**

Análise comparativa entre as variações percentuais de pesos do décimo quarto dia de infecção malárica pelo *Plasmodium berghei* ANKA, nos camundongos CBA e Balb/C, para os seguintes tratamentos: 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S) e solução de sacarose 0,8M (Pb+S).

Modelo murino	Grupos	Média $\Delta\% \pm DP$	Variação percentual em relação ao peso inicial
CBA	Pb+S	-0,0830 $\pm$ 0,07	12,25
	Pb+T+S	-0,04986 $\pm$ 0,06	16,52
Balb/C	Pb+S	-0,06714 $\pm$ 0,04	22,07
	Pb+T+S	-0,2040 $\pm$ 0,12	19,42

$\Delta\%$  entre os grupos Pb+S e PB+T+S dos camundongos CBA:  $p=0,666$ , Mann-Whitney.

$\Delta\%$  entre os grupos Pb+S e PB+T+S dos camundongos Balb/C:  $p=0,01$ , Mann-Whitney.

$\Delta\%$  entre Pb+S CBA e Pb+S Balb/C:  $p=1$ , Mann-Whitney.

$\Delta\%$  entre Pb+T+S CBA e Pb+T+S Balb/C:  $p=0,36$ , Mann-Whitney.

**Tabela 03**

Influência do tratamento com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+T), 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S), solução de sacarose 0,8M (Pb+S) e água destilada (Pb) sobre o hematócrito no quarto dia de infecção de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Hematócrito (%) – Balb/C			
	Quarto dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb	10	1	0,7-1,5	0,4-1,8
Pb+T	10	4,8	3,9-8,2	0,4-9,2
Pb+T+S	10	0,6	0,2-1,1	0-1,6
Pb+S	9	3	1-4,8	0,6-6

P<0,0001, Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos: Pb+S x Pb, Pb+S x Pb+T, Pb+T+S x Pb, Pb+T+S x Pb+T (p<0,0001); Pb+S x Pb+T+S e Pb+T x Pb (p>0,05).

**Tabela 04**

Influência do tratamento com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+T), 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S), solução de sacarose 0,8M (Pb+S) e água destilada (Pb) sobre o hematócrito no nono dia de infecção de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Hematócrito (%) – Balb/C			
	Nono dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb	10	14	10,4-28,5	6,6-59,2
Pb+T	9	16,6	10,3-25	0,8-25,8
Pb+T+S	10	13,3	10,8-15,5	3,4-26,8
Pb+S	9	17	15,4-21,1	11,2-36,7

P=0,0005, Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn para comparação entre os grupo: Pb+S x Pb, Pb+S x Pb+T, Pb+T+S x Pb+T (p<0,05); Pb+S x Pb+T+S e Pb x Pb+T (p<0,05).

**Tabela 05**

Influência do tratamento com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+T), 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S), solução de sacarose 0,8M (Pb+S) e água destilada (Pb) sobre o hematócrito no décimo quinto dia de infecção de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Hematócrito (%) – Balb/C			
	Décimo quinto dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb	6	33,5	24,7-44,9	24-50,8
Pb+T	7	31,8	26-44	20,4-49
Pb+T+S	9	42	20,2-46,3	15,4-80
Pb+S	7	42,6	22,8-56,8	20-58,6

$p < 0,034$ , Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 06**

Influência do tratamento com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+T), 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S), solução de sacarose 0,8M (Pb+S) e água destilada (Pb) sobre o hematócrito no vigésimo primeiro dia de infecção de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Hematócrito (%) – Balb/C			
	Vigésimo primeiro dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb	6	45,8	31,5-58	28-59
Pb+T	6	46,2	43,2-49	42,4-51,2
Pb+T+S	5	51,2	42,5-72,3	37-80
Pb+S	5	52	48,1-74,3	48-87

$p = 0,002$ , Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos: Pb+S x Pb e Pb x Pb+T+S ( $p < 0,01$ ); Pb+S x Pb+T+S, Pb+S x Pb+T, Pb x Pb+T e Pb+T+S x Pb+T ( $p > 0,05$ )

**Tabela 07**

Influência do tratamento com 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S) e solução de sacarose 0,8M (Pb+S) sobre o hematócrito no quarto dia de infecção de camundongos CBA, susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Hematócrito (%) – CBA			
	Quarto dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb+S	8	0,2	0-0,6	0-1,8
Pb+T+S	8	-	0,1-1,8	0-2,8

p=0,09, teste *t*.

**Tabela 08**

Influência do tratamento com 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S) e solução de sacarose 0,8M (Pb+S) sobre o hematócrito no nono dia de infecção de camundongos CBA, susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Hematócrito (%) – CBA			
	Nono dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb+S	6	13,1	4-16,5	0,2-17,4
Pb+T+S	8	13,6	5,6-15	2-18,4

p=0,08, Mann-Whitney.



**Tabela 09**

Influência do tratamento com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+T), 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S), solução de sacarose 0,8M (Pb+S) e água destilada (Pb) sobre a parasitemia no quarto dia de infecção de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Parasitemia (%) – Balb/C			
	Quarto dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb	10	65	61-72,7	55-79
Pb+T	10	63	58-70	52-76
Pb+T+S	10	54	51-55	49-56
Pb+S	10	52,5	50-54	44-55

P<0,0001, ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos: Pb+T x Pb+T+S, Pb+T x Pb+S, Pb x Pb+T+S, Pb x Pb+S e Pb+S x Pb+T+S (p<0,05); Pb+T x Pb (p>0,05).

**Tabela 10**

Influência do tratamento com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+T), 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S), solução de sacarose 0,8M (Pb+S) e água destilada (Pb) sobre a parasitemia no nono dia de infecção de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Parasitemia (%) – Balb/C			
	Nono dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb	10	37	34-40	30-58
Pb+T	10	38	32,5-43	32-53
Pb+T+S	9	29	24-31	17-55
Pb+S	10	26	23-32,5	20-39

p=0,376, Kruskal-Wallis.

**Tabela 11**

Influência do tratamento com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+T), 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S), solução de sacarose 0,8M (Pb+S) e água destilada (Pb) sobre a parasitemia no décimo quinto dia de infecção de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Parasitemia (%) – Balb/C			
	Décimo quinto dia			
	N	Mediana	Quartis	Extremos
Pb	6	27,5	24,5-33	22-36
Pb+T	9	30	25,5-34	25-36
Pb+T+S	8	24	20,5-27	19-42
Pb+S	7	27	20-26	19-28

p=0,793, Kruskal-Wallis.

**Tabela 12**

Influência do tratamento com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+T), 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S), solução de sacarose 0,8M (Pb+S) e água destilada (Pb) sobre a parasitemia no vigésimo primeiro dia de infecção de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Parasitemia (%) – Balb/C			
	Vigésimo primeiro dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb	6	25,5	17-30,5	14-31
Pb+T	5	15	13-18	11-20
Pb+T+S	6	11	11-15	11-19
Pb+S	6	11	11-12,5	11-13

p=0,118, Kruskal-Wallis.

**Tabela 13**

Influência do tratamento 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S) e solução de sacarose 0,8M (Pb+S) sobre a parasitemia no quarto dia de infecção de camundongos CBA, susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Parasitemia (%) – CBA			
	Quarto dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb+S	8	56,5	51,5-62	50-66
Pb+T+S	8	52	51-55	50-56

p=0,09, teste *t*.

**Tabela 14**

Influência do tratamento 150 mg/Kg/dia de talidomida diluída em solução de sacarose 0,8M (Pb+T+S) e solução de sacarose 0,8M (Pb+S) sobre a parasitemia no nono dia de infecção de camundongos CBA, susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

GRUPOS	Parasitemia (%) – CBA			
	Nono dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Pb+S	6	48,7	39-54,5	31-57
Pb+T+S	8	36,5	33-45,5	32-50

p=0,08, Mann-Whitney.

**Tabela 15**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Índice Fagocitário – Balb/C			
	1x10 <sup>6</sup> leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	10	64	38,7-99	24-115,5
Tal	9	42	27-107,3	16,5-141,5
Pb	7	55	23-95,5	12-147,5
Pb+Tal	10	49,5	17,2-98,5	13,5-128,5

p=0,931, ANOVA.

**Tabela 16**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – Balb/C			
	1x10 <sup>6</sup> leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	10	29	18-41	6,5-47,5
Tal	9	22,5	13,2-42	9,5-51,5
Pb	7	26,5	10,5-36	7-47,5
Pb+Tal	10	24,5	12,2-32	5,5-44

p=0,803, ANOVA.

**Tabela 17**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – Balb/C			
	$1 \times 10^6$ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	2,4	1,9-2,8	1-4,5
Tal	9	2,1	1,8-2,6	1,7-2,9
Pb	8	1,9	1,6-2,1	1,3-4,1
Pb+Tal	10	2,2	1,7-2,9	1,4-4

p=0,758, ANOVA.

**Tabela 18**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Índice Fagocitário – CBA			
	$1 \times 10^6$ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	28	-	10,5-33
Tal	3	8	-	2-13,5
Pb	2	10,2	-	6-14,5
Pb+Tal	4	6,2	1,7-14	1-18

p=0,257, Kruskal-Wallis.

**Tabela 19**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – CBA			
	$1 \times 10^6$ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	9,5	-	6-10,5
Tal	3	6	-	1-9
Pb	2	5,5	-	2-9
Pb+Tal	4	3	1-6,7	0,5-9

p=0,265, Kruskal-Wallis.

**Tabela 20**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – CBA			
	$1 \times 10^6$ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	2,9	-	1,7-3,1
Tal	3	1,5	-	1,3-2
Pb	2	2,3	-	1,6-3
Pb+Tal	4	2,0	1,8-2,2	1,7-2,2

p=0,276, Kruskal-Wallis,.

**Tabela 21**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Índice Fagocitário - Balb/C			
	4x10 <sup>6</sup> leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	95,5	42-108,5	32-227
Tal	8	138,3	76,5-240	50,5-249
Pb	9	77	23,7-127,5	18-167,5
Pb+Tal	13	59	32,2-122	15-211,5

p=0,064, ANOVA.

**Tabela 22**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – Balb/C			
	4x10 <sup>6</sup> leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	38,5	19-43,5	9-55,5
Tal	8	38,2	26,7-59,2	19-74,5
Pb	9	25,5	10,7-46	9-55,5
Pb+Tal	13	24	15,5-39	8,5-59

p=0,232, ANOVA.

**Tabela 23**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – Balb/C			
	4x10 <sup>6</sup> leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	2,8	2,4-3,5	1,8-4,1
Tal	8	3,5	3,1-4	1,9-4,2
Pb	9	2,5	2,1-3,4	1,8-3,9
Pb+Tal	13	2,5	2,1-3,5	1,8-4

p=0,193, Kruskal-Wallis.

**Tabela 24**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Índice Fagocitário – CBA			
	4x10 <sup>6</sup> leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	24	-	17,5-61
Tal	3	15	-	14,5-41
Pb	4	19	6,2-69	2-40,5
Pb+Tal	5	11,5	7,7-29,5	4-34,5

p=0,659, Kruskal-Wallis.



**Tabela 25**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – CBA			
	$4 \times 10^6$ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	9,5	-	9-2
Tal	3	7,5	-	7,5-10,5
Pb	4	8,7	3,2-22,5	1-33
Pb+Tal	5	5	4,2-14,2	4-16,5

p=0,738, Kruskal-Wallis.

**Tabela 26**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – CBA			
	$4 \times 10^6$ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	2,7	-	1,8-3
Tal	3	2	-	1,4-5,5
Pb	4	2,1	1,9-2,8	1,9-3,3
Pb+Tal	5	2,1	1,5-2,4	1-2,6

p=0,941, Kruskal-Wallis.

**Tabela 27**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Índice Fagocitário – Balb/C			
	1x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	292	198,3-540,1	64,5-755
Tal	10	371,3	236,3-441,5	124,5-552,5
Pb	8	318,5	254,3-404,5	105,5-669,5
Pb+Tal	13	322	230,3-455	181,5-641

p=0,999, ANOVA.

**Tabela 28**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – Balb/C			
	1x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	50,5	35-80	17-95,5
Tal	10	68,5	48,7-83,7	39-88,5
Pb	8	72,5	57,2-83,7	34,5-92
Pb+Tal	13	63,5	58,2-86,7	24,5-93

p=0,564, ANOVA.

**Tabela 29**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – Balb/C			
	1x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	4,9	2,9-6,6	2,1-10
Tal	10	5,1	3,8-6,3	3,2-6,9
Pb	8	4,3	3,9-5,8	3,1-7,3
Pb+Tal	13	5	3,6-6,2	3,3-7,4

p=0,937, Kruskal-Wallis.

**Tabela 30**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Índice Fagocitário - CBA			
	1x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	42	-	32-71
Tal	3	16,5	-	4,5-58,5
Pb	4	40,7	28-87,2	16-133
Pb+Tal	4	48,5	29,2-51,2	12-52

p=0,833, Kruskal-Wallis.

**Tabela 31**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – CBA			
	1x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	17,5	-	16-25
Tal	3	10,5	-	1,5-29,5
Pb	4	16,2	10,5-23,7	7,5-28,5
Pb+Tal	4	19,7	13,5-20,5	7,5-21

p=0,924, Kruskal-Wallis.

**Tabela 32**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $1 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/ingeridas – CBA			
	1x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	2,4	-	2-2,8
Tal	3	2	-	1,6-3
Pb	4	2,6	2,1-3,9	2,1-4,7
Pb+Tal	4	2,4	2-2,5	1,6-2,

p=0,619, Kruskal-Wallis.

**Tabela 33**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Índice Fagocitário – Balb/C			
	4x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	416	269,5-690,5	183-935,5
Tal	9	486	328,8-645,3	201-828
Pb	11	540	221,5-692,5	149,5-918,5
Pb+Tal	12	576	386-784,5	163-958,5

p=0,826, ANOVA.

**Tabela 34**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – Balb/C			
	4x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	59	50-86,5	32-96,5
Tal	9	66,5	56,5-81,7	48-94
Pb	11	75,5	49,5-82	38-96
Pb+Tal	12	77,5	57-90,2	30-90

p=0,822, ANOVA.

**Tabela 35**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – Balb/C			
	4x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	7,3	6,2-8	5,2-10,1
Tal	9	6,7	5-9	4,2-9,7
Pb	11	6,6	4,3-9,1	3,2-10,5
Pb+Tal	12	7,8	6,2-8,8	3,7-10,9

p=0,795 ANOVA.

**Tabela 36**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Índice Fagocitário – Camundongos CBA			
	4x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	98	-	38-105
Tal	3	85	-	27-99
Pb	4	80,7	51,7-180,8	44,5-259
Pb+Tal	5	40,5	29,7-45,2	23-49

p=0,164, Kruskal-Wallis.

**Tabela 37**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – CBA			
	4x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3	25	-	15-29
Tal	3	21	-	15,5-32,5
Pb	4	19,2	16,5-40,2	15,5-59,5
Pb+Tal	5	12,5	9-17	8,5-18,5

p=0,140, Kruskal-Wallis.

**Tabela 38**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando  $4 \times 10^6$  leveduras sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – CBA			
	4x10 <sup>6</sup> leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	3,4	3,4	-	2,5-4,1
Tal	3	3	-	1,7-4
Pb	3,9	3,9	3,1-4,6	2,9-4,9
Pb+Tal	2,7	2,7	2,5-3,8	2,3-4,3

p=0,412, Kruskal-Wallis.

**Tabela 39**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de fator de necrose tumoral (FNT), *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	FNT – Basal – Sobrenadante das Culturas				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	9	223,6	191,1-419,8	61,4-514,6	289,2±49,14
Tal	7	162,5	90,2-274,3	36,1-325,1	171,8±37,76
Pb	9	445,9	73-866,7	48,1-153	528,7±174,9
Pb+Tal	12	262,9	80,1-645,7	31,7-943,4	366,2±95,7

p=0,5, Kruskal-Wallis.

**Tabela 40**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de fator de necrose tumoral (FNT), após estímulo com LPS, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	FNT – LPS – Sobrenadante das Culturas				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	7	359,8	256,2-522,8	90,6-531,5	355,3±58,9
Tal	10	198,2	128,7-532,1	25,3-816,9	301±84,2
Pb	10	431,1	86-1005	48,4-1331	535,6±146,4
Pb+Tal	12	486,3	123,7-599,3	58,4-1042	443,9±88,4

p=0,630, Kruskal-Wallis.



**Tabela 41**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a quantidade de fator de necrose tumoral (FNT) presente no soro de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	FNT – Soro				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	13	27,7	23-31,5	11,5-39,5	27,4±2
Tal	13	25,5	24,2-31	12,5-31,9	25,8±1,6
Pb	13	37,7	25,2-41,9	13,3-63,4	35,1±3,7
Pb+Tal	13	28,9	26,5-39,3	21-41,6	32,1±1,9

p=0,01, ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos. A comparação dos grupos Tal e Pb apresentou significância (p<0,05).

**Tabela 42**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de fator de necrose tumoral (FNT), *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	FNT – Basal – Sobrenadante das Culturas				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	3	81,4	-	68-83,3	77,5±4,8
Tal	3	48	-	25,9-97,4	57,1±21,12
Pb	4	76,5	62-110,1	49,6-141,6	86±19,6
Pb+Tal	5	49,5	37-77,8	28,1-88,2	55,8±10,2

p=0,39 Kruskal-Wallis.

**Tabela 43**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de fator de necrose tumoral (FNT), após estímulo com LPS, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	FNT – LPS – Sobrenadante das Culturas				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	3	57,2	-	35,3-82	58,2±13,5
Tal	3	44,8	-	26,1-92,2	54,4±19,6
Pb	4	78,7	63,1-133,7	57,1-178,9	98,4±27,6
Pb+Tal	5	48,5	36,5-62,7	26,1-66,4	49,4±6,8

p=0,32, Kruskal-Wallis.

**Tabela 44**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a quantidade de fator de necrose tumoral (FNT) presente no soro de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	FNT – Soro				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	3	23,2	-	17,6-33,3	24,7±4,6
Tal	3	30,4	-	24,1-32,8	29,1±2,6
Pb	4	33,5	27,7-38,3	26,7-38,3	33±3,1
Pb+Tal	5	31,5	28,2-35,9	24,9-37,2	32±2,1

p=0,38, Kruskal-Wallis.

**Tabela 45**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Peróxido de hidrogênio - Basal				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	13	43,1	32,9-78,2	15,6-90,7	51,8±6,7
Tal	12	50,4	34,7-73,4	19,5-96,5	52,9±6,5
Pb	13	45,2	36,6-76,4	16,7-103,6	55±6,9
Pb+Tal	12	46,7	37-78,7	10,6-115,5	55,8±8,4

A determinação da produção de peróxido de hidrogênio no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais foi realizada no oitavo dia de infecção, pela microtécnica de Pick e Keisari. p=0,976, ANOVA.

**Tabela 46**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de peróxido de hidrogênio após estímulo com PMA, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Peróxido de hidrogênio – PMA				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	13	51,9	38,6-80,5	15,5-59,7	57,8±7
Tal	12	48,2	36,6-89,1	14,9-97,2	57,4±8
Pb	13	52,2	36,7-82,3	21,2-102,5	59,4±7,3
Pb+Tal	12	56,7	41-82,2	10,7-91,6	59±7,4

A determinação da produção de peróxido de hidrogênio no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais foi realizada no oitavo dia de infecção, pela microtécnica de Pick e Keisari. p=0,997, ANOVA.

**Tabela 47**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Peróxido de hidrogênio – Basal				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	3	39,2	-	15,6-43,1	32,6±8,6
Tal	3	49	-	19,5-52,6	40,4±10,5
Pb	4	42	28,1-44,8	16,7-45,2	36,4±7
Pb+Tal	5	42,1	24,3-54,6	10,6-60,3	40±8,3

A determinação da produção de peróxido de hidrogênio no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais foi realizada no oitavo dia de infecção, pela microtécnica de Pick e Keisari.  $p=0,647$ , Kruskal-Wallis.

**Tabela 48**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de peróxido de hidrogênio após estímulo com PMA, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Peróxido de hidrogênio – PMA				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	3	47,9	-	15,5-51,9	38,5±11,5
Tal	3	43,4	-	14,9-53	37,1±11,4
Pb	4	41,7	31,4-47	21,2-52,2	39,2±6,5
Pb+Tal	5	46,2	27,5-56,7	10,7-62,8	42,9±8,7

A determinação da produção de peróxido de hidrogênio no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais foi realizada no oitavo dia de infecção, pela microtécnica de Pick e Keisari.  $p=0,942$ , Kruskal-Wallis.

**Tabela 49**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Óxido Nítrico – Basal				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	11	353,8	291,1-581,2	245-892,9	454,6±70,4
Tal	13	309,2	278,9-544,9	236-857,3	424,9±53,3
Pb	12	473,4	306,5-1135	221,3-1516	766,2±172,7
Pb+Tal	13	382,4	301,9-732,2	269,5-1537	586±131,1

p=0,438, Kruskal-Wallis.

**Tabela 50**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de óxido nítrico após estímulo com LPS, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Óxido Nítrico – LPS				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	10	323,9	285,5-414,5	246,4-496,1	342,3±25,4
Tal	13	316,2	265,3-463,3	217,2-1150	394,2±68,2
Pb	12	543,6	329,5-1051	229,7-3054	820,9±223,9
Pb+Tal	13	429,1	301,9-1381	254,8-2709	880,1±234,1

p=0,048, Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn. Não houve diferença significativa quando os grupos foram comparados entre si.

**Tabela 51**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de óxido nítrico após estímulo com INF- $\gamma$ , *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Óxido Nítrico – INF- $\gamma$				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média DP
Controle	10	328,7	291,8-529,6	256,2-726,2	396,5±50
Tal	13	313,4	285,2-488,1	248,5-926,4	356,6±51,8
Pb	12	490,2	333,6-647,8	233,9-2288	652,1±160,1
Pb+Tal	13	457	342-1102	274,3-2843	801,1±208,3

p=0,066, Kruskal-Wallis.

**Tabela 52**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de óxido nítrico após estímulo com LPS e INF- $\gamma$ , *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Óxido Nítrico – LPS e INF- $\gamma$				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	11	361,5	305-469,6	250,6-706,7	397,8±38,6
Tal	13	310,6	288,3-478,7	219,2-1458	470,7±95,8
Pb	12	529,6	314,5-891,9	247,8-1820	648,2±131,5
Pb+Tal	13	372	314,1-781,7	252,7-2677	723,2±204,9

p=0,497, Kruskal-Wallis.

**Tabela 53**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongo susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Óxido Nítrico –Basal				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	3	321,8	-	317,-331,5	323,6±4,1
Tal	3	323,8	-	294,6-418	345,5±37,2
Pb	4	317,6	266,3-361,9	221,3-399,5	317,1±36,6
Pb+Tal	5	275,7	270,5-321,8	269,5-325,9	292±12,2

p=0,468, Kruskal-Wallis

**Tabela 54**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de óxido nítrico após estímulo com LPS, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Óxido Nítrico – LPS				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	3	464	-	328-703,9	498,6±109,9
Tal	3	528,2	-	325,9-593,7	482,6±80,6
Pb	4	318,7	266,7-365,4	215,8-411	316±40
Pb+Tal	5	278,5	273,6-337,5	271,5-353,1	301±16,1

p=0,060, Kruskal-Wallis.

**Tabela 55**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de óxido nítrico após estímulo com INF- $\gamma$ , *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Óxido Nítrico – INF- $\gamma$				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
Controle	3	409,6	-	340,6-434,7	395 $\pm$ 28,1
Tal	3	306,4	-	277,1-309,2	297,6 $\pm$ 10,3
Pb	4	297	254,1-324,9	221,3-340,7	289,5 $\pm$ 25,5
Pb+Tal	5	234,1	269,1-317,6	261,1-325,9	291,5 $\pm$ 11,6

p=0,106, Kruskal-Wallis.

**Tabela 56**

Influência do tratamento com talidomida diluída em 100 µL de solução de sacarose a 0,8M sobre a produção basal de óxido nítrico após estímulo com LPS e INF- $\gamma$ , *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com solução de sacarose 0,8M (Controle) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Tal) e animais infectados tratados com solução de sacarose 0,8M (Pb) ou com 150 mg/Kg/dia de talidomida (Pb+Tal).

GRUPOS	Óxido Nítrico – LPS e INF- $\gamma$				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
Controle	3	512,8	-	351-617,4	493,7 $\pm$ 77,5
Tal	3	454,3	-	328-794,6	525,6 $\pm$ 139,3
Pb	4	344,8	326-880,7	307,1-1417	603,3 $\pm$ 271,2
Pb+Tal	5	281,3	270,2-311,3	267,4-313,4	288,8 $\pm$ 9,6

p=0,035, Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação entre os grupos. Não houve diferença significativa quando os grupos foram comparados entre si.



## **ANEXO REAGENTES**

**2- mercaptoetanol** – 2-hidroxietilmercaptan;  $\beta$ -mercaptoetanol. M6250 da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> INC, lote 101K1257, Saint Louis – Missouri, EUA.

**Coloração panótica** – kit Instant-prov da Newprov Produtos para Laboratório LTDA, lote 4601, Pinhais – Paraná, Brasil.

**Entellan** – Prod OB354749 da Merk, lote 1079610100, Darmstadt– Alemanha.

**Éter etílico PA** – Cód. R3852.00 da Dinâmica Reagentes Analíticos, lote 11336, São Paulo – SP.

**Formaldeído PA** – Cód 112 da Vetec Química Fina LTDA, Lote 971458, Duque de Caxias – Rio de Janeiro, RJ.

**Giemsa** - coloração da Doles Reagentes, lote Giem 1121, Goiânia – Goiás, Brasil.

**Glutamina** – L-2-ácido aminoglutarâmico. G5763 da Sigma- Aldrich<sup>®</sup> INC, lote 124H03025, Saint Louis – Missouri, EUA.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio da Merk, lote K2728110 951, Darmstadt– Alemanha.

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> PA** – ácido orto xaroposo. Prod 10016 Reagem da Quimibrás Indústrias Química AS, lote 060310 - Rio de Janeiro, RJ.

**Hepes** – n-[2-hidroxi etil] piperazina-N'-[2-ácido etano sulfônico]. H3375 da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> INC, lote 32K5459, Saint Louis – Missouri, EUA.

**Interferon- $\gamma$**  – citocina recombinante de camundongo expresso em *E. coli*. I4777 da Sigma- Aldrich<sup>®</sup> INC, lote 055K0925, Saint Louis – Missouri, EUA.

**LPS** – lipopolysaccharides de *Escherichia coli* O55:B5. L2880 da Sigma- Aldrich<sup>®</sup> INC, lote 114K4105, Saint Louis – Missouri, EUA.

**Metanol absoluto** – Prod 10158 AnalaR<sup>®</sup> da BDH Chemicals, lote 59583300, Cidade – Estado, Inglaterra.

**Need** – n-(1-naftil)etilenodiamina. N9125 da Sigma- Aldrich<sup>®</sup> INC, lote 111K0089, Saint Louis – Missouri, EUA.

**Nigrosina** – N4754 da Sigma- Aldrich<sup>®</sup> INC, lote 72F-0286, Saint Louis – Missouri, EUA.

**Peroxidase** – peróxido de hidrogênio oxireductase da *Amoracia rusticana* tipo 1 contendo 148 unidades de purpurogalina/mg. Ec 1.11.1.7 da Sigma- Aldrich<sup>®</sup> INC, CAS 9003-99-0, Saint Louis – Missouri, EUA.

**PMA** – 13-acetato forbol 12-miristato. P8139 da Sigma-Aldrich INC, lote 42K1555, Saint Louis – Missouri, EUA.

**RPMI 1640** – Meio de cultura acrescido de L-glutamina. R6504-1L da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> INC, lote 124k8306, Saint Louis – Missouri, EUA.

**Sulfanilamida** – p-aminobenzeno sulfonamida. S9251 da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> INC, lote 101K2010, Saint Louis – Missouri, EUA.

**Talidomida** – Nome comercial: Talidomida 100 mg. Fundação Ezequiel Dias – FUNED – Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, lote 04060415, Belo Horizonte, MG, Brasil.

**Vermelho de fenol** – fenolsulfoftaleína. Prod. 7241 da Merk, lote 70168909, Darmstadt– Alemanha.