

Mariangela Souza de Oliveira

Influência das drogas antiparasitárias cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a capacidade fagocitária, expressão de corpúsculo lipidico e produção de radicais de oxigênio e nitrogênio pelos monócitos humanos estimulados com eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum*.

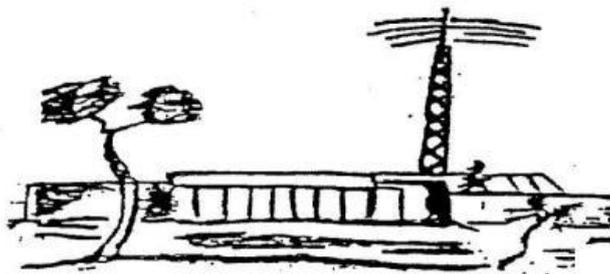
BRASÍLIA/DF

2015

Mariangela Souza de Oliveira

Influência das drogas antiparasitárias cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a capacidade fagocitária, expressão de corpúsculo lipídico e produção de radicais de oxigênio e nitrogênio pelos monócitos humanos estimulados com eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum*.

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



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

BRASÍLIA/DF

2015

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

S48 Souza de Oliveira, Mariangela
Olivi Influência das drogas antiparasitárias
cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a
capacidade fagocitária, expressão de corpúsculo
lipídico e produção de radicais de oxigênio e
nitrogênio pelos monócitos humanos estimulados com
eritrócitos parasitados pelo Plasmodium falciparum. /
Mariangela Souza de Oliveira; orientador Maria
Imaculada Muniz Barboza Junqueira. -- Brasília, 2015.
148 p.

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

1. Cloroquina. 2. Primaquina. 3. Quinina. 4.
Corpúsculo lipídico. 5. Malária. I. Muniz Barboza
Junqueira, Maria Imaculada, orient. II. Título.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Mariangela Souza de Oliveira

Influência das drogas antiparasitárias cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a capacidade fagocitária, expressão de corpúsculo lipídico e produção de radicais de oxigênio e nitrogênio pelos monócitos humanos estimulados com eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum*.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA- UnB

Medicina Tropical: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias

DATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

20 de Julho de 2015

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof Dr Gustavo Sierra Romero- UnB
(Banca titular)

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

Dedicatória

À Deus, minha mãe, meu marido, amigos e orientadora pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela minha vida e por me manter firme em meus propósitos de vida.

À minha mãe, que é tudo na minha e maior exemplo de amor ao próximo.

Aos meus irmãos e irmãs, pelo carinho e incentivo.

Aos meus sobrinhos, por serem a alegria da minha vida.

Ao meu marido Jean Claude Ribeiro, pelo companheirismo, paciência e amor.

Às minhas cunhadas, pelo incentivo.

À professora Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira, minha orientadora e chefe, pela oportunidade que me foi confiada, pelo incentivo e apoio em momentos de fraqueza. Pelo conhecimento a mim transmitido, pela paciência e persistência, generosidade, dedicação, reconhecimento e amorosidade. Muito obrigada por tudo!

Ao meu eterno amigo e companheiro de trabalho Nelson Pellet do Nascimento (in memória), por tudo o que me ensinou durante os três anos que estagiei no laboratório de malária, seus conhecimentos transmitidos que tornaram possível a realização desse trabalho.

À minha amiga Shirley Claudino Pereira Couto, companheira de mestrado e experimentos.

À Luciana Flannery pela oportunidade de estágio e técnicas que foram desenvolvidas no Laboratório de Malária nesse período.

À amiga Helane Dantas do Nascimento, pelo carinho e cuidado com minha saúde.

À Prof^a Tatiana Karla Borges, por ajudar com protocolos e tirando dúvidas.

Às estagiárias do laboratório de imunologia Débora, Elisabete, Aline, Ana Carolina pela preparação dos materiais e ajuda nos experimentos.

Ao técnico Wallace Santos, pelas incontáveis horas que passou ao nosso lado realizando os experimentos.

*Ao amigo Wagner Mesquita, por sempre está disposto a ajudar e por fornecer o soro necessário para a cultura do *P. falciparum*.*

À Samara, pela amizade.

Ao amigo Ewerton, por sempre consertar o meu computador.

A todos os colegas e professores da pós-graduação em Medicina Tropical pelo convívio e aprendizado.

Ao ministério da saúde, em nome de Márcia Helena M. F. Almeida e Joyce Mendes (CGPNCM), por cederem as drogas utilizadas neste estudo.

*Aos voluntários do estudo, por doarem o sangue necessário para os experimentos.
Muito obrigada!*

Aos membros da banca por cederem seu tempo para a avaliação desse trabalho.

A todos que contribuíram para tornar esse trabalho possível.

APOIO

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVIII
1. Introdução.....	1
1.2 Epidemiologia.....	2
1.3 Parasitos e ciclo biológico.....	3
1.4 Mecanismos de defesa antiplasmódio.....	4
1.5. Papel da imunidade inata na defesa contra o plasmódio.....	5
1.6. Drogas antiparasitárias.....	6
1.7. Ação imunomoduladora de drogas na malária.....	8
1.8. Justificativa.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Delineamento experimental.....	14
3.2 Grupos de estudo.....	15
3.3 Testes experimentais.....	18
3.3.1 Cepa do <i>Plasmodium falciparum</i>	18
3.3.2 Preparo dos eritrócitos parasitados para utilização nos testes de fagocitose e expressão de corpúsculos lipídicos.....	18
3.3.3 Concentrações das drogas antiplasmódio utilizadas nos experimentos <i>in vitro</i>	18
3.3.4 Separação dos monócitos pelo gradiente de Percoll e por aderência à lâmina para o teste de fagocitose em placa e expressão de corpúsculos lipídicos.....	19
3.3.5 Avaliação da influência das drogas antimaláricas sobre a fagocitose pelos monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos e pelos receptores para opsoninas.....	20
3.3.6 Expressão de corpúsculos lipídicos detectada pela coloração com óleo vermelho O quando os monócitos foram estimulados com eritrócitos infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> tratados ou não com os antimaláricos.....	23
3.3.7 Influência das drogas antimaláricas cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a produção <i>in vitro</i> de óxido nítrico após incubação dos monócitos com eritrócitos infectados com <i>Plasmodium falciparum</i>	24
3.3.8 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio utilizamos a técnica da oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase após incubação dos monócitos com eritrócitos infectados ou não com <i>Plasmodium falciparum</i> e tratados ou não com as drogas antimalárica.....	25
3.4 Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	27

4.1	Influência do tratamento de monócitos de indivíduos normais e/ou dos eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> com cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina, sobre a capacidade fagocitária.....	28
4.2	Influência do tratamento <i>in vitro</i> com cloroquina de monócitos de indivíduos normais e/ou de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas.....	28
4.3	Influência do tratamento <i>in vitro</i> de monócitos de indivíduos normais e/ou de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> com cloroquina sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	32
4.4	Influência do tratamento <i>in vitro</i> de monócitos de indivíduos normais e/ou de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> com a primaquina sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas.....	36
4.5	Influência do tratamento <i>in vitro</i> com a primaquina de monócitos de indivíduos normais e/ou de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	40
4.6	Influência do tratamento <i>in vitro</i> com o sulfato de quinina de monócitos de indivíduos normais e/ou de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas.....	44
4.7	Influência do tratamento <i>in vitro</i> com o sulfato de quinina de monócitos de indivíduos normais e/ou de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	48
4.8	Corpúsculos Lipídicos.....	53
4.8.1	Influência do tratamento <i>in vitro</i> com a cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos estimulados pelos receptores para opsoninas com eritrócitos parasitados pelo <i>P. falciparum</i>	53
4.8.2	Influência do tratamento <i>in vitro</i> com a cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos estimulados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos com eritrócitos parasitados pelo <i>P. falciparum</i>	55
4.9	Produção de Óxido Nítrico.....	56
4.9.1	Influência da cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pelos eritrócitos infectados por <i>P. falciparum</i> pelos monócitos humanos.....	56
4.10	Produção de Peróxido de Hidrogênio.....	59
4.10.1	Influência da cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos humanos estimulados por eritrócitos infectados ou não com <i>P. falciparum</i>	59
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÕES	74
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8	ANEXOS	86

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Delineamento experimental	15
Figura 2 . Influência da cloroquina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados sensibilizados com soro humano fresco.....	29
Figura 3. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel sensibilizadas com soro humano fresco.....	30
Figura 4. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte sensibilizadas com soro humano fresco.....	31
Figura 5. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas hemozoína sensibilizadas com soro humano fresco.....	32
Figura 6. Influência da cloroquina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados não sensibilizados	33
Figura 7. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel não sensibilizadas.....	34
Figura 8. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte não sensibilizadas.....	35
Figura 9. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em hemozoína não sensibilizadas.....	36
Figura 10. Influência da primaquina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados sensibilizados com soro humano fresco.....	37
Figura 11. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel sensibilizadas com soro humano fresco.....	38
Figura 12. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte sensibilizadas com soro humano fresco	39
Figura 13. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em hemozoína sensibilizadas com soro humano fresco	40
Figura 14. Influência da primaquina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados não sensibilizados.....	41
Figura 15. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel não sensibilizadas.....	42

Figura 16. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte não sensibilizadas.....	43
Figura 17. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em hemozoína não sensibilizadas.....	44
Figura 18. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados sensibilizados com soro humano fresco.....	45
Figura 19. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel sensibilizadas com soro humano fresco.....	46
Figura 20. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte sensibilizadas com soro humano fresco.....	47
Figura 21. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em hemozoína sensibilizadas com soro humano fresco.....	48
Figura 22. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados não sensibilizados.....	49
Figura 23. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel não sensibilizadas.....	51
Figura 24. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte não sensibilizada.....	52
Figura 25. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em hemozoína não sensibilizadas.....	53
Figura 26. Influência da cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre o índice corpuscular (IC), número médio de corpúsculos lipídicos expressos por monócito e proporção de monócitos expressando corpúsculo lipídico de monócitos humanos estimulados por eritrócitos parasitados pelo <i>P. falciparum</i> sensibilizados.....	54
Figura 27. Influência da cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre o índice corpuscular (IC), número médio de corpúsculos lipídicos expressos por monócito e proporção de monócitos expressando corpúsculo lipídico de monócitos humanos estimulados por eritrócitos parasitados pelo <i>P. falciparum</i> não sensibilizados.....	56
Figura 28. Influência da cloroquina, primaquina e sulfato de quinina na produção de óxido nítrico pelos monócitos estimulados ou não com <i>P. falciparum</i>	58

Figura 29. Produção de H ₂ O ₂ pelos monócitos estimulados ou não com o <i>P. falciparum</i>	60
Tabela 1. Resumo dos dados antropométricos.....	16
Tabela 2. Resumo dos resultados.....	61
Tabela 3. Resumo das conclusões.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido dextrorribonucleico
ARNm	Acido Ribonucleico mensageiro
C3	Fração 3 do complemento
C4	Fração 4 do complemento
Ca²⁺	Cálcio
CD36	Receptor de limpeza ligante do lipídico de densidade baixa
CL	Corpúsculo Lipídico
CMN	Células mononucleares
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO₂	Gás Carbônico
COX	Ciclooxigenase
CR	Receptor do complemento
CR1	Receptor de complemento 1
FAHUB	Fundação de Apoio ao Hospital Universitário de Brasília
FNT	Fator de necrose tumoral
G6PD	Glucose-6 Fosfato Desidrogenase
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
H₃PO₄	Ácido Fosfórico
IC	Índice corpuscular
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IF	Índice fagocitário
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interlucina
IMC	Índice de massa corporal
LOX	lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarideo
LQFEx	Laboratório Químico Farmacêutico do Exército
LT CD8	LinfócitoT CD8
MCL	Média de corpúsculos lipídicos

Mg²⁺	Magnésio
MS	Ministério da Saúde
MYD88	Proteína do gene da resposta primária mieloide 88
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaNO₂	Nítrito de sódio
NaOH	hidróxido de sodio
NF-κ B	Fator Nuclear -κB
NK	Células Natural Killer
NKT	Células T invariantes Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NO₂	Dióxido de Nitrogênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PfEMP	Proteína de citoaderência ligada ao gene assexual do <i>Plasmodium falciparum</i>
PPAR	Receptor ativado pelo proliferador do peroxisoma
rPMP	Receptores para padrões moleculares de patógenos
SFB	Soro fetal bovino
STF	Salina tamponada com fosfato
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
TLR	Receptores semelhantes a toll
WHO	World Health Organization
rOPS	receptor de Opsoninas

RESUMO

XV

O tratamento precoce e eficiente com drogas antimaláricas é a medida mais importante para o controle da malária e para prevenção das formas graves da doença. O maior motivo de preocupação é a resistência que as espécies de plasmódio têm apresentado ao longo do tempo à essas drogas. A cloroquina e a primaquina são os medicamentos de escolha para o tratamento da infecção pelo *P. vivax* e o sulfato de quinina é a opção para gestantes com malária no primeiro trimestre da gravidez e em crianças menores de seis meses pelo *P. falciparum*. Embora esses fármacos já estejam disponíveis para uso há longo tempo no arsenal terapêutico da malária, a ação deles sobre a fagocitose, expressão de corpúsculo lipídico (CL) e produção de radicais de oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO) pelos monócitos humanos ainda não foram totalmente elucidadas. Diante desse cenário o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a capacidade fagocitária, expressão de CL e produção de NO e H_2O_2 pelos monócitos humanos de indivíduos saudáveis para eritrócitos infectados com *P. falciparum*. Foram retirados 20 ml de sangue periférico de 52 indivíduos. Para o teste de fagocitose foram avaliadas a capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores para opsoninas (rOps) e pelos receptores para padrões moleculares de patógeno (rPMP) os mesmos utilizados na quantificação da expressão de CL. As drogas foram utilizadas nas concentrações de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a cloroquina; 0,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a primaquina e 5,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o sulfato de quinina. O índice fagocitário (IF) foi determinado em 500 monócitos. A expressão dos CL foi quantificada pelo índice corpuscular (IC) em 200 monócitos. A produção do NO foi avaliada nos sobrenadantes das culturas dos monócitos pela reação de Griess e a produção de H_2O_2 foi determinada pela técnica da oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. A cloroquina deprimiu o IF dos monócitos pelos rOps, em todas as situações analisadas ($p < 0,05$), tanto pelo tratamento dos monócitos e dos eritrócitos parasitados (9,4 para 7,8), quanto dos monócitos (9,4 para 6,3) ou eritrócitos parasitados (9,4 para 6,3) isoladamente. Isso se deveu ao menor envolvimento dos monócitos na fagocitose ($p < 0,05$), pois não houve alteração da média de parasitos ingeridos ($p > 0,05$). Para a primaquina, apenas o tratamento dos monócitos e dos eritrócitos parasitados deprimiu significativamente o IF (9,4 para 3,4, $p = 0,03$) pelos rOps, e também se deveu ao menor envolvimento de monócitos na fagocitose ($p < 0,05$). Resultado semelhante foi observado quando testado pelos rPMP. Para o sulfato de quinina, houve aumento no número de parasitos ingeridos pelos rPMP (1 para 5,6, $p = 0,01$), entretanto, esse aumento foi contrabalanceado pela diminuição na proporção de monócitos fagocitando (9,9 para 5,4, $p = 0,06$), o que resultou na diminuição no IF (9,9 para 5,1, $p = 0,08$), quando os monócitos e os eritrócitos foram

tratados. Quando analisamos a influência das drogas sobre a expressão dos CL verificamos a diminuição quando os monócitos foram estimulados com eritrócitos parasitados pelo rPMP ($p < 0,01$), devido à menor proporção de monócitos expressando CL. Quando os monócitos foram estimulados pelos receptores para Ops não houve mudança significativa na expressão dos CL. Quando os monócitos foram incubados com os eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum*, houve aumento da produção de H_2O_2 ($p=0,009$). O estímulo com os eritrócitos parasitados não modificou a produção do NO pelos monócitos, e também nenhuma droga alterou essa produção ($p > 0,05$). Nossos dados mostraram que a cloroquina teve efeito depressor sobre os fagócitos, seja quando os monócitos foram tratados ou quando os eritrócitos foram tratados com a droga. A diminuição da expressão de CL pelos monócitos estimulados com eritrócitos infectados pelos rPMP, mas não pelos rOps, indica que a expressão dessas organelas foi dependente da via que o monócito foi estimulado pelo parasito. O sulfato de quinina aumentou a ingestão dos parasitas, mas diminuiu o número de monócitos fagocitando sugerindo que sua ação ocorreu tanto no fagócito quanto no parasito. É possível que a elevada concentração que a droga atinge dentro do eritrócito, tenha contribuído para os mecanismos microbicidas contra o plasmódio, e tenha facilitado a ingestão dos parasitos pelos fagócitos. Entretanto, devido sua ação depressora sobre o monócito, a capacidade fagocitária total resultou deprimida quando do tratamento com o sulfato de quinina, sugerindo que essas drogas possam também modular a fagocitose dos parasitos. Em conclusão, nossos dados mostraram que essas drogas podem ter um efeito imunomodulador sobre as funções dos monócitos que se somam aos seus efeitos antiparasitários no tratamento da malária por essas drogas.

ABSTRACT

Early and effective treatment with antimalarial drugs is the most important action for malaria control and prevention of severe forms of the disease. The major concern in malaria treatment is the development of drug resistance by parasites. Chloroquine and primaquine are the drugs of choice for the treatment of *P. vivax* infection and quinine sulfate is the option for pregnant women in the first trimester pregnancy and children under six months old by *P. falciparum*. Although these drugs are for a long time available for malaria treatment, their actions on phagocytosis, lipid body (LB) expression and production of oxygen (H_2O_2) and nitrogen (NO) radicals by human monocytes have still not been completely clarified. The aim of this study was to evaluate the influence of chloroquine, primaquine and quinine sulfate on phagocytic capacity, lipid body expression and nitric oxide and hydrogen peroxide production by human monocytes to *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. Blood was collected from 52 healthy individuals. Phagocytosis was assessed through opsonin receptors (rOps) and pathogen-associated molecular pattern receptors (rPAMP) the same used in the quantification of CL expression by oil red staining. NO was assessed by Greiss reaction and H_2O_2 production was assessed by red phenol oxidation in presence of peroxidase. The concentrations of 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for chloroquine, 0,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for primaquine and 5,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for quinine sulfate were used. Phagocytic index (PI) was assessed in 500 monocytes. LB was expressed by the corpuscular index (CI) quantified in 200 monocytes. Chloroquine depressed by the IF monocytes rOps, when monocytes and infected red blood cells were treated (9.4 to 7.8), only monocytes were treated (9.4 to 6.3) and only infected red blood cells were treated (9.4 to 6.3) there was a decrease in monocyte PI ($p < 0.05$). This occurred because a lower involvement of monocytes in phagocytosis ($p < 0.05$), and no change in the average number of parasites ingested was observed ($p > 0.05$). For primaquine, only when monocytes and parasitized erythrocytes were treated, there was a significantly decreased PI (9.4 to 3.4, $p = 0.03$) through rOPs, caused by a lower involvement of monocyte in phagocytosis ($p < 0.05$). Similar results were observed when tested by rPAMP. For quinine sulfate, there was an increase in the number of parasites ingested through rPAMP (1 to 5.6, $p = 0.01$). However, this increase was counterbalanced by a decrease in the proportion of monocytes phagocytosing (9.9 to 5.4, $p = 0.06$), which resulted in a decrease in the PI (9.9 to 5.1, $p = 0.08$) when monocytes and red blood cells were treated. Chloroquine, primaquine and quinine sulfate decreased LB expression when monocytes were stimulated by parasitized erythrocytes through rPAMP ($p < 0.01$), due to a lower proportion of monocytes expressing lipid body. When monocytes were stimulated through opsonin receptors, there was no significant change in the expression of LB. When monocytes

were incubated with *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes, there was an increase in H₂O₂ production ($p = 0.009$). *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes did not change NO production by monocytes, as no tested drug did ($p > 0.05$). Our data showed that chloroquine decreased monocyte functions, both when monocytes were treated and when erythrocytes were treated with the drug. The decreased LB expression by monocytes stimulated through rPAMP, but not by rOps, indicates that the expression of these organelles depended on the pathway that monocytes were stimulated by parasite. Quinine sulfate increased the intake of parasites, but decreased the number of monocytes phagocytosing, suggesting that the drug acted on phagocytes and parasites. It is possible that the high concentration the drug reaches within the erythrocyte has contributed to the microbicidal mechanism against the *Plasmodium*, and that had facilitated the ingestion of parasites by phagocytes. However, because of the immunodepression on monocyte functions, the phagocytic capacity resulted decreased upon treatment with quinine sulfate, suggesting that these drugs may also modulate phagocytosis of parasites. In conclusion, our data showed that chloroquine, primaquine and quinine sulfate had an immunomodulatory effect on monocyte functions that added to their antiparasitic effects in the treatment of malaria by these drugs.

INTRODUÇÃO

A malária faz parte de um grupo de doenças infecciosas e parasitárias que acomete principalmente as populações mais pobres e vulneráveis e contribui para a continuação dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social, em razão principalmente de seu impacto na saúde infantil, na redução da produtividade da população trabalhadora e na promoção do estigma social. Destaca-se como uma das mais importantes doenças tropicais (MS, 2010).

1.2. Epidemiologia

Dados epidemiológicos da malária

A malária causa grande impacto na saúde e no desenvolvimento econômico das populações humanas, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais. Para o ano 2000, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que a cada ano ocorressem 300 a 500 milhões de novos casos clínicos e ocorreram 2,7 milhões de mortes (WHO, 2000). Porém, em seu relatório do ano de 2009 mostrou uma redução nos casos de malária. Cerca de 85% dos casos ocorreram na África, onde o principal causador da doença é o *P. falciparum*, respondendo a 98% dos casos. Segundo a OMS, 198 milhões de casos de malária ocorreu globalmente em 2013 e que a doença levou a 584 mil mortes, representando uma redução de casos de malária em incidência e mortalidade de 30 % e 47% desde 2000, respectivamente (WHO, 2014). O fardo é mais pesado na Região Africana, onde se estima que ocorrem 90% de todas as mortes por malária, e em crianças com idade inferior a 5 anos, que representam 78% de todas as mortes (WHO, 2014).

Aproximadamente 99% dos casos de malária no Brasil ocorrem na Região Amazônica, que é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e oeste do Maranhão. Três espécies de plasmódio são responsáveis pelos casos de malária humana no Brasil: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS, 2014).

No ano de 2013 foram registrados 143.261 mil casos de malária, sendo 83% causados pelo *P. vivax*, 15% *P. falciparum*, 1% por infecções mistas e 0,02% por *P. malariae* (Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS, 2014).

1.3. Parasitos e Ciclo biológico

Há 5 espécies do parasito da malária capaz de determinar doença no homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e a espécie mais recente descrita afetando seres humanos, o *P. knowlesi* (Antinori, 2012). O ciclo de vida do plasmódio compreende dois hospedeiros, o inseto vetor, fêmeas do mosquito *Anopheles* sp., onde ocorre a reprodução sexuada do parasito, e o hospedeiro vertebrado, no qual ocorre a reprodução assexuada.

A infecção do hospedeiro humano inicia-se quando a fêmea do mosquito *Anopheles* infectada com as formas em esporozoítos faz o repasto sanguíneo e nesse momento inocula o parasito na epiderme do hospedeiro, estes seguem para o fígado, onde realizam o primeiro ciclo esquizogônico no interior dos hepatócitos. Uma vez no sistema circulatório os esporozoítos atingem o fígado infectando os hepatócitos, e iniciando a fase exo-eritrocitária do ciclo. Durante esse ciclo, em infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, formas latentes denominadas hipnozoítos ficam nos hepatócitos por tempo variável causando recaídas da doença (Krotoski, 1982). Nos hepatócitos os parasitos se multiplicam formando os merozoítos, que rompem o hepatócito e ganham a circulação sanguínea. Os novos merozoítos que são formados e liberados na circulação sanguínea, infectam novos eritrócitos mantendo assim ciclos intra-eritrocitários. Durante o processo de esquizogonia eritrocitária, alguns merozoítos se diferenciam em macrogametas ou microgametas, que ao serem ingeridos pelo mosquito, realizam a reprodução sexuada, chamada esporogonia, na qual serão formados novos esporozoítos após serem ingeridos pelo vetor (Dyer e Day,

2000). As principais manifestações clínicas da doença, como febre, mialgias e convulsões ocorrem justamente durante a liberação dos merozoítos no sangue (Antinori e cols, 2012; Wirth e Pradel, 2012).

Na invasão dos eritrócitos, os merozoítos utilizam mecanismos complexos ligando-se a uma gama de antígenos de superfície diferentes.

1.4. Mecanismos de defesa antiplasmódio

O desenvolvimento de imunidade contra o plasmódio pode ocorrer em indivíduos que vivem em áreas endêmicas, porém ela só acontece após várias infecções pelo parasito. Ela ocorre pelo aumento dos anticorpos específicos contra o merozoíto, que medeiam a resistência do hospedeiro ao parasito, bloqueiam a entrada do plasmódio nos eritrócitos por meio de opsoninas e favorecem a fagocitose e eliminação pelos macrófagos (Stevenson, 2004).

Após a picada do anofelino infectado, os esporozoítos inoculados movem-se rapidamente da derme para o fígado, onde eles passam por uma fase clinicamente assintomática de divisão rápida antes que o parasito entre novamente na corrente sanguínea. No sangue, a expansão exponencial das populações de parasitos leva à doença febril. Normalmente, a infecção aguda é controlada e a infecção crônica é estabelecida com uma quantidade relativamente baixa de parasitos, com episódios intermitentes de febre associados com picos de maior parasitemia (Miller,2000).

Nessa fase inicial, a defesa contra os plasmódios ocorre pelos anticorpos anti-esporozoítos, que os neutralizam antes da invasão dos hepatócitos; e também na defesa contra as formas em desenvolvimento no fígado, levando à morte dos parasitos intra-hepáticos pelo IFN- γ e pelas células T CD8+, natural killer (NK), natural killer T (NKT) e as células T $\gamma\delta$.

A defesa contra as formas sanguíneas que ocorre pelos anticorpos contra os merozoítos, atuam pela opsonização dos parasitos facilitando sua

captura pelos fagócitos, como também inibem a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos; os anticorpos contra eritrócitos infectados bloqueiam a adesão dos eritrócitos parasitados ao endotélio e impedem o sequestro de gametócitos; a ativação de macrófagos pelo FNT e IFN- γ aumenta a fagocitose; os anticorpos neutralizam a molécula glicosilfosfatidilinositol do parasito e previnem a inflamação excessiva; os anticorpos e o complemento medeiam a lise de gametócitos e impedem a fecundação e desenvolvimento do parasito no mosquito; os fagócitos produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio microbicidas contra o parasito (Langhorne, 2008).

1.5. Papel da imunidade inata na defesa contra o plasmódio

Durante à infecção, os esporozoítos estimulam a expressão de genes de IFN do tipo 1, que são induzidos nos hepatócitos quando ocorre a replicação no vacúolo parasitóforo (Liehl, 2014; Miller, 2014). Esse IFN 1 medeia o recrutamento de células natural killer (NK) e células NKT, que são importantes fontes de IFN- γ , e desencadeiam expressão de proteínas que medeiam o controle da replicação do parasito, como os que estão envolvidos na produção de óxido nítrico e outros componentes tóxicos, que interferem com esquizogonia do parasito no fígado (Liehl, 2014; Miller, 2014).

Como cada esporozoíto é capaz de gerar milhares de merozoítos, o IFN 1 do tipo 1 não é suficiente para controlar o crescimento do parasito (Liehl, 2014; Miller, 2014). Os parasitos que sobrevivem ao controle imunológico no fígado e são liberados na corrente sanguínea, onde eles iniciam o ciclo eritrocitário e causam a malária em indivíduos não imunes. O receptor semelhante ao Toll, a via do NF- κ B induzível, citocinas pró-inflamatórias e os genes de IFN-induzível são regulados positivamente durante o ciclo eritrocitária na malária humana (Franklin, 2009; Sexton, 2004; Ockenhouse, 2006; Sharma, 2011). O IFN- γ também tem um papel importante estimulando células imunes inatas e promovendo respostas pró-inflamatórias, e ativando as funções efetoras de macrófagos que medeiam a resistência à infecção (Antonelli, 2014; Sponaas, 2009).

1.6. Drogas antiparasitárias

A primaquina é uma 8-aminoquinolina ativa contra gametócitos de todas as espécies e hipnozoítos hepáticos de *P. vivax* e *P. ovale* (Marques, 2001; Mueller e cols., 2009; Wells e cols., 2010), possuindo pouca ou nenhuma ação contra as formas dos estágios eritrocitários do parasito. Este efeito hipnozoiticida da primaquina é função da dose total e não da duração do tratamento, e a sensibilidade dos hipnozoítos de *P. vivax* ao medicamento tem variações geográficas (Marques, 2001). A utilização da droga é recomendada também em áreas endêmicas da malária pelo *P. falciparum*, uma vez que esse fármaco possui ação contra os gametócitos, inibindo a evolução do parasito no vetor anofelino e conseqüentemente interrompendo a transmissão da doença (WHO, 2009). Em doses elevadas, a primaquina é também atuante contra as fases assexuadas, mas em doses maiores ela pode ser tóxica (Marques, 2001).

Atualmente, o tratamento da malária pelo *P. falciparum* é feito com a associação dos derivados da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada da planta *Artemisia annua*, por pesquisadores chineses (de Ridder e cols., 2008; WHO, 2009).

A quinina foi a primeira droga antimalárica a ser caracterizada e apesar de sua toxicidade, continua sendo utilizada no tratamento da malária cerebral, causada pelo *P. falciparum*, inclusive em crianças menores de cinco anos de idade na África (WHO, 2009). Porém seu uso está restrito as áreas onde as cepas dessa espécie não são resistentes ou quando administradas com outros fármacos podem ser utilizadas nessas áreas com resistência comprovada (Marques, 2001). No Brasil, associada com doxiciclina ou tetraciclina ela ainda é a droga empregada no tratamento da malária pelo *P. falciparum* não grave e/ou complicada (Marques, 2001; Brasil 2010).

A síntese da cloroquina foi baseada na quinina. Ela é uma 4-aminoquinolina, que foi sintetizada durante a Segunda Guerra Mundial

(Sweeney, 2000). Durante décadas, a cloroquina foi utilizada na terapêutica e profilaxia de todos os tipos de malária, por sua alta eficácia contra as formas sanguíneas do parasito, associada à sua baixa toxicidade e seu baixo custo (Rosenthal, 2003; Martin e cols., 2009). Para todas as espécies do parasito, ela tem rápida atividade esquizonticida e é gametocitocida para o *P. vivax* e *P. malariae* e não tem ação contra formas hepáticas (Marques, 2001; Brasil 2010). A cloroquina tem também ação antipirética e anti-inflamatória (Marques, 2001).

Depois que os merozoítos invadem os eritrócitos, a sua sobrevivência depende da digestão da hemoglobina, que se processa no interior do vacúolo digestivo do parasito, e é mediada por uma série de proteases, entre elas as plasmepsinas e falcipainas (Olliaro e Goldberg, 1995). Durante o catabolismo da hemoglobina, sua porção proteica é utilizada como fonte de aminoácidos pelo parasito, e a fração heme, denominada ferriprotoporfirina IX, é liberada, sendo um grupo reativo, gerador de radicais livres que são tóxicos para o parasito (Sullivan, 2002).

Há mais de 50 anos, a cloroquina é utilizada como um antimalárico padrão, e ainda assim, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado (Koncarevic e cols., 2007). Por ser uma base fraca a cloroquina é acumulada no vacúolo digestivo. Quando em pH fisiológico, a cloroquina encontra-se desprotonada, porém no vacúolo digestivo, onde o pH é ácido, ela passa a ser protonada, perdendo a capacidade de atravessar a membrana plasmática (Bray e cols., 2005). Um dos mecanismos de ação mais aceito para a cloroquina é a formação de uma ligação covalente com o grupo heme, inibindo a geração dos cristais de hemozoína (Sullivan 2002; Fitch, 2004) e gerando grande produção de radicais livres que causam danos oxidativos às biomoléculas, como as proteínas, o ADN e os lipídeos. Esses danos são responsáveis por gerar modificações estruturais irreversíveis, além da perda da função biológica do plasmódio (Radfar e cols., 2008). Independente do acúmulo da cloroquina no vacúolo digestivo, outros efeitos já foram descritos, como por exemplo sua interação com a

molécula de ADN, levando a alterações da sua estrutura e ao bloqueio da sua síntese (Stephen e cols., 2000).

1.7. Ação imunomoduladora de drogas na malária

As drogas que tem origem na quinolina são a cloroquina, quinina, quinidina, amodiaquina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina e primaquina e elas inibem a atividade da polimerase de heme no vacúolo digestivo do parasito, o que interfere com a conversão do heme, que é um intermediário tóxico produzido durante a degradação da hemoglobina, em hemozoína não tóxica ou pigmento malárico; também têm uma ação secundária envolvendo a inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas do parasito (Chassaingne, 2001).

Os mecanismos pelos quais as drogas antimaláricas modulam o sistema imunitário ainda não foram completamente elucidados, mas já está definido que a cloroquina se acumula em organelas ácidas, como endossomas, lisossomas e complexo de Golgi e interfere na produção de prostaglandinas e possui atividade anti-inflamatória por inibir enzimas lisossomais, estabiliza as membranas lisossomais, deprime a quimiotaxia e fagocitose de polimorfonucleares (Prasad e cols, 1986; Robert, 1993; Slater, 1993; Shalmiev, e cols., 1996; Foley e Tilley, 1998; Davis, 2012). Ela penetra livremente nas células atingindo os lisossomos, que possuem o interior ácido tornando-o básico, prejudicando a ação de diversas enzimas que dependem do meio ácido para atuar, e evita a liberação de enzimas de seu interior. O acúmulo do fármaco diminui a concentração de ferro intracelular e induz estresse oxidativo (Gostner e cols., 2012). Outro efeito da cloroquina é a inibição da interação antígeno-anticorpo e inibição da formação de imunocomplexos, altera o sistema imune pela inibição da produção de IL-1 e inibição da síntese de prostaglandinas e de citocinas pró-inflamatórias (Laurence, 2012) . Estudos indicam que a cloroquina reduz a expressão do FNT- α , IL-1 e IL-6 induzida por macrófagos através da redução da

estabilidade, nível de ARN mensageiro e de células T auxiliar através da redução da apresentação de antígeno (Jang e cols.,2006; Silva e cols., 2013).

A ação da primaquina é atribuída à interferência na estrutura do ADN do parasito, depositando a droga entre os pares de bases e parando a replicação do material genético. Ela também produz metabólitos altamente reativos que podem gerar potenciais oxidativos intracelulares na produção de espécies reativas de oxigênio ou até mesmo interferir na função da ubiquinona no transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial (Marques, 2001; Ferreira, 2011). A primaquina pode causar hemólise em pessoas com deficiência de glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), podendo causar ocasionalmente anemia hemolítica grave, hemoglobinemia e insuficiência renal. O efeito depende do grau de deficiência da enzima, a dose ministrada do fármaco e do padrão da exposição. Essa droga age sobre formas intra-hepática (hipnozoítos) e é a única que pode causar cura dessas formas de parasitas da malária tornando-os dormentes no fígado (*P. vivax* e *P. ovale*) (Chassaigne, 2001).

O sulfato de quinino possui algumas ações semelhantes à cloroquina, como a inibição da síntese de ácido nucléico, síntese de proteínas e glicólise no *P. falciparum* e pode vincular-se à hemazoina em eritrócitos parasitados. Essa droga antimalárica pode interferir com a produção e a função do neurotransmissor serotonina (Islahudin, 2014). O sulfato de quinina pode reduzir níveis de FNT, diminuir a expressão de receptores de adesão, e ainda diminuir a fagocitose (Shalmiev, e cols., 1996; Muniz-Junqueira, 2007; Golenser e cols., 2006).

1.8. Justificativa

O tratamento precoce e eficaz com drogas antimaláricas é a medida mais importante para o controle da malária e para prevenção das formas graves da doença. A emergência de resistência do parasito aos antimaláricos é a maior ameaça ao seu controle. A cloroquina e a

primaquina são os medicamentos de escolha para o tratamento da infecção pelo *P. vivax* e o sulfato de quinina é a opção terapêutica para gestantes com malária no primeiro trimestre da gravidez e em crianças menores de seis meses. Os mecanismos imunológicos de defesa antiparasitária desempenham um papel importante para conter a evolução da infecção pelo parasito. A influência da cloroquina, primaquina e quinina sobre a fagocitose e a produção de radicais livres pelos monócitos, que fazem parte dos mecanismos fisiológicos mais importantes de eliminação dos parasitos, não está ainda totalmente esclarecida. Como também sua influência sobre a biogênese dos corpúsculos lipídicos, que encontram-se aumentados pela infecção malárica, e que são estruturas onde se formam moléculas importantes para modulação da defesa antiparasitária, não está ainda esclarecida. Portanto, torna-se necessário avaliar a influência dessas drogas sobre as funções dos monócitos, que são células chaves envolvidas na defesa antiparasitária. Esses esclarecimentos contribuirão para terapêutica mais adequada dos indivíduos acometidos pela doença, como também para a descoberta de novos alvos que possam ser modulados para prevenir as formas graves da malária.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do tratamento com as das drogas antimaláricas cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre as funções dos monócitos envolvidas na defesa inata contra as formas eritrocitárias do *Plasmodium falciparum*.

2.2. Objetivos específicos:

Avaliar a influência da cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a capacidade fagocitária, expressão de corpúsculos lipídicos e produção de radicais de oxigênio e nitrogênio pelos monócitos humanos de doadores saudáveis para eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum*.

METODOLOGIA

3.1. Delineamento experimental

Neste trabalho foi avaliada a influência *in vitro* das drogas antiplasmodiais cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre a capacidade funcional dos monócitos de indivíduos saudáveis.

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

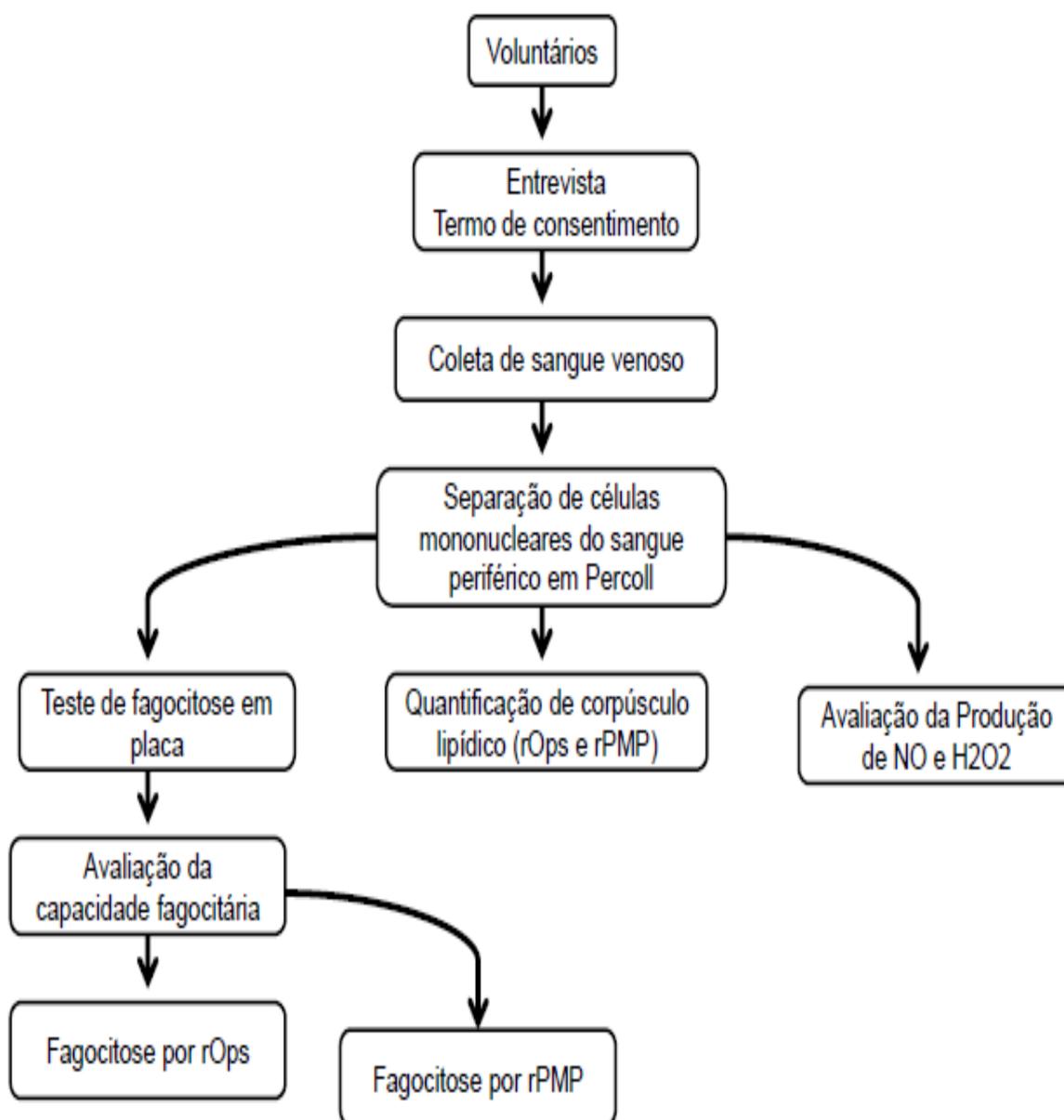


Figura 1. Delineamento experimental

3.2. Grupos de estudo

Estudo realizado no laboratório de Malária do Núcleo de Medicina Tropical e no laboratório de Imunologia Celular da Área de Patologia da Faculdade de Medicina, ambos da Universidade de Brasília.

No desenvolvimento do estudo foram seguidas as normas éticas para pesquisa científica em seres humanos estabelecidas pela Declaração

Helsinki (WMA, 2013) e pelo Ministério da Saúde Brasileiro, resolução 196/96 (CNS, 1996).

A pesquisa, encaixada dentro do grupo de risco mínimo, foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, parecer número 365.997 (**Anexo I**).

Para o estudo foram selecionamos 52 indivíduos saudáveis para os testes de fagocitose, quantificação de corpúsculo lipídico e avaliação da produção do NO e H₂O₂, (**Tabela 1**).

Tabela 1. Resumo dos dados antropométricos.

Teste	Número de Indivíduos	Homens/ Mulheres	Média ± DP de Idade (anos)	Média ± DP de peso (Kg)	Altura ± DP (M)	IMC ± DP
Fagocitos e	15	12/3	32,47± 8,83	73,33± 7,72	1,69± 0,06	25,5± 3,2
Corpúscu lo Lipídico	6	4/2	26,5±4,85	71,33± 10,13	1,73± 0,09	23,6± 2,61
NO e H ₂ O ₂	31	23/8	34,7±8,8	71,19±9,57	1,69± 0,09	24,9± 3,12
Total	52	39/13	31,22±4,23	71,9±1,2	1,70±0,02	24,6± 0,97

IMC- Índice de Massa Corporal; NO- Óxido Nítrico; H₂O₂- Peróxido de hidrogênio.

Para esse estudo foram selecionadas pessoas que não apresentavam doença aparente ou declarada, com idade entre 18 e 55 anos, e que não eram de áreas endêmicas da malária.

E os critérios para exclusão foram idosos, pessoas em uso de medicamentos ou que apresentassem doenças pré-existentes (doenças reumáticas, alérgicas, câncer, doenças infecciosas, endócrinas como *Diabetes mellitus*, obesidade, tabagismo, alcoolismo e etc.), ou qualquer característica informada em seu histórico clínico que de alguma forma pudesse influenciar as funções do sistema imunitário do indivíduo.

A coleta iniciou após os voluntários estarem cientes dos objetivos da pesquisa e dos procedimentos a serem realizados e após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo II**).

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

Os fármacos utilizados foram gentilmente cedidos pelo Programa Nacional de Malária do Ministério da Saúde Brasileiro. Esta pesquisa foi elaborada e desenvolvida com total isenção de quaisquer conflitos de interesse

Os grupos de indivíduos que participaram deste trabalho tinham as seguintes características: no estudo da função fagocitária, em relação ao gênero, 12 eram homens e 3 eram mulheres, com média de idade de $32,47 \pm 8,83$, variando entre 21 e 47 anos; e média do peso de $73,33 \pm 7,72$, variando entre 61 e 88; a média da altura foi de $1,69 \pm 0,06$, variando entre 1,6 e 1,8 m e com índice de massa corporal (IMC) médio de 25,5 (**Anexo III**)

Dentre os participantes que foram feita a quantificação de corpúsculo lipídico em relação ao gênero 4 eram homens e 2 eram mulheres. Com idade média de $26,5 \pm 4,84$, variando entre 20 e 31anos ; média de peso de $71,19 \pm 10,13$, variando entre 55 a 86 kg; média de altura de $1,73 \pm 0,09$, variando entre 1,57 a 1,86 m e com índice de massa corporal (IMC) médio de 23,66 (**Anexo IV**).

Os parâmetros antropométricos para os participantes em que foram avaliadas a produção dos radicais livres em relação ao gênero 23 eram homens e 8 era mulheres. Com idade média de $34,7 \pm 8,8$, variando entre 21 a 53 anos ; a média de peso de $71,19 \pm 9,57$, variando entre 46 e 89kg; média de altura de $1,69 \pm 0,09$, variando entre 1,46 a 1,85 m e índice de massa corporal (IMC) médio de 24,9 (**Anexo V**).

3.3. Testes experimentais

3.3.1. Cepa de *Plasmodium falciparum*

Nos experimentos foi utilizada a cepa do *Plasmodium falciparum* NF-54, que é sensível à cloroquina, gentilmente cedida pelo Professor Doutor Gerhard Wunderlich, do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo, e conservada em nitrogênio líquido.

O *P. falciparum* foi o parasito de escolha para nosso estudo por ser possível seu cultivo em cultura e ele infectar tanto eritrócitos jovens quanto os envelhecidos, já o *P. vivax* não possui essas características. Para uso nos experimentos o *P. falciparum* foi mantido em cultivo contínuo, segundo a técnica Trager and Jansen modificada (Trager e Jansen, 1976; Muniz-Junqueira e cols, 2001), em eritrócitos O⁺ de doador único e saudável, hematócrito de 4%, suspensos em RPMI 1640 tamponado com 20 mM/L HEPES e 7.5% NaHCO₃ (26.7 mL/L) e suplementado com 0.25 mg/dL hipoxantina em 10% pool de soro humano, inativado a 37°C por 30 min em banho Maria, em 5% CO₂ em ar, a 37°C.

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

No dia de cada experimento era retirada uma alíquota de 20µL das culturas na qual era feita a determinação do número total de eritócitos por mL, em câmara de Neubauer, e em um distendido era determinada a parasitemia, pela quantificação da porcentagem de eritrócitos parasitados, em 1000 eritrócitos. Eram quantificadas a porcentagem de formas em anel, esquizonte e trofozoíta. Foram utilizadas sempre que a parasitemia estava superior à 9% e com predominância de formas em esquizonte.

3.3.3. Concentrações das drogas antiplasmódio utilizadas nos experimentos *in vitro*.

Os monócitos e/ou os eritrócitos parasitados com *P. falciparum* foram pré-tratados com 0,25 µg/mL de cloroquina por 60 minutos, que representa o pico máximo obtido em seres humanos após injeção da droga. Foi utilizada a apresentação comprimido de 150 mg de cloroquina (Difosfato de Cloroquina, Farmanguinhos). A escolha desta concentração baseou-se em estudo farmacocinético da droga efetuado em seres humanos, no qual se determinou que após a ingestão de 600 mg de cloroquina ocorre em média um pico sérico de 0,25 µg/mL, sendo que esta concentração foi alcançada após 1h da ingestão do comprimido (Salako,1985).

Em relação à primaquina (Difosfato de Primaquina, Farmanguinhos), os monócitos e/ou eritrócitos parasitados com *P. falciparum* foram pré-incubados com 0,24 µg/mL deste medicamento por 60 min. A droga estava na forma de comprimido de 5 mg. Esta concentração corresponde ao pico plasmático observado após a ingestão de 45mg da droga (Fletcher, 1981).

Para o sulfato de quinina (Sulfato de quinina, Laboratório Químico Farmacêutico do Exército- LQFEx), o medicamento apresentava-se na forma de comprimido de 500 mg. Os monócitos e/ou os eritrócitos parasitados com *P. falciparum* foram pré-incubados com 5,6 µg/mL do medicamento por 60 minutos, que é a concentração que corresponde ao pico plasmático médio observado após 1 h da ingestão de 600 mg deste fármaco (Wanwimolruk, 1991).

O preparo das diluições dos comprimidos dessas drogas foram realizadas no dia de cada teste, primeiramente em salina tamponada com fosfato e depois em meio RPMI completo.

3.3.4. Separação dos monócitos pelo gradiente de Percoll e por aderência à lâmina para o teste de fagocitose em placa e expressão de corpúsculos lipídicos

Foram coletados de cada indivíduo voluntário 20mL de sangue venoso em tubo vacutainer estéril heparinizado. O sangue era centrifugado 400g por 10 min para obtenção do soro que era utilizado para sensibilizar os

eritrócitos parasitados. O restante do sangue era ressuspensão em salina tamponada com fosfato (STF) gelada ao volume inicial e centrifugado em gradiente de Percoll (Sigma, cidade da Sigma, USA), densidade 1,077, a 750g por 15 min, 4°C na proporção de 3 mL de Percoll para cada 5 mL de sangue. As células mononucleares (CMN) recuperadas eram ressuspensas em 10 mL de STF gelada e centrifugada a 400g por 10 min, a 4°C, para retirar o Percoll. Após o sobrenadante ser desprezado, as células eram novamente ressuspensas em 10 mL de STF gelada e centrifugadas a 200g, por 10 min, a 4°C, para retirar as plaquetas. Desprezava-se o sobrenadante e ressuspensava-se as CMN em 2 mL de RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) incompleto com 2,6% de bicarbonato de sódio 7,5%. As células eram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade era determinada pela exclusão da nigrosina e foi sempre superior 95%. As células eram mantidas refrigeradas durante todo o procedimento. As CMN, em uma suspensão contendo 1×10^6 em um volume de 500 μ L de meio incompleto, eram distribuídas por escavação em placas de 24 escavações (TTP, Trasadingen, Switzerland), estéreis, de fundo chato, às quais tinham sido previamente colocado lamínulas de 13 mm de diâmetro, estéreis.

As placas eram incubadas em câmara úmida a 37°C, em 5% de CO₂ em ar, por 2 horas, para permitir a aderência dos monócitos à lamínula. Transcorrido esse período, as preparações eram lavadas 2 vezes com STF para retirar as células não aderentes. Os monócitos aderidos foram utilizados para o teste de avaliação da influência das drogas sobre a fagocitose e sobre a expressão de corpúsculos lipídicos.

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

A partir da preparação acima descrita, os monócitos aderidos à lamínula foram utilizados para o teste de fagocitose em placa. A fagocitose foi testada de duas formas: quando os eritrócitos parasitados foram ingeridos

pelos receptores para opsoninas e quando foram ingeridos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.

A capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores para opsoninas, principalmente os componentes do sistema complemento, foi realizada pela sensibilização prévia dos eritrócitos infectados com o *P. falciparum* com o soro do próprio doador. Foi feita utilizando eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum* que tinham ou não sofrido a influência das drogas antiparasitárias por 60 min e/ou com o tratamento prévio dos monócitos com as drogas ou RPMI 1640, por 60 min.

A sensibilização dos eritrócitos infectados foi feita pela incubação prévia por 30 min, a 37°C, com soro fresco do próprio doador a 10% do volume final. Quando os eritrócitos infectados são incubados com o soro fresco, as frações do sistema do complemento presentes no soro adsorvem-se à superfície dos eritrócitos parasitados propiciando a fagocitose pelos monócitos pelos receptores para as frações do complemento.

Para avaliação da fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, o soro fresco foi substituído por soro fetal bovino inativado a 37°C por 30 min em banho-maria, e os eritrócitos submetidos ao mesmo procedimento de incubação por 30 min, a 37°C.

A avaliação da fagocitose, tanto pelos receptores para PMPs quanto pelos receptores para opsoninas três abordagens diferentes em relação ao tratamento com as drogas antimaláricas foram feitas: a) apenas os monócitos foram previamente tratados com os antimaláricos cloroquina, primaquina e sulfato de quinina. B) somente os eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* foram previamente tratados com os antimaláricos. C) tanto os monócitos quanto os eritrócitos parasitados foram tratados previamente com os antimaláricos. Esses grupos foram formados para discriminar se as drogas antimaláricas estavam modulando diretamente a função dos monócitos ou se a ação antiparasitária das drogas estava facilitando a fagocitose dos parasitos pelo fato deles terem sofrido modificações pela ação das drogas, facilitando assim a sua ingestão, ou ainda se ambos, os

monócitos e os eritrócitos parasitados, estavam sofrendo a ação das drogas, modificando suas atividades. As drogas foram utilizadas nas concentrações anteriormente citadas. Para comparar os resultados encontrados nos grupos que receberam tratamento com os fármacos antimaláricos, foram feitos grupos controles onde as células recebiam no lugar apenas RPMI completo com SFB, repetindo todas as incubações e lavagens feitas nos outros grupos.

Os monócitos aderidos à lamínula, como acima descrito, foram tratados com as drogas ou com RPMI por 1 hora, e após esse período, distribuiu-se sobre essas células 1×10^6 eritrócitos infectados com *P. falciparum* tratados com as drogas ou com RPMI nas doses acima descritas previamente por 1 h e previamente sensibilizados ou não com o soro do próprio doador.

As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida, em CO₂ a 5% em ar para permitir a fagocitose dos eritrócitos parasitados (adaptado de Muniz-Junqueira e cols., 2001), realizado em duplicata para cada preparação. As preparações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C para retirar as hemácias não aderidas/ingeridas e posteriormente com RPMI contendo 30% de SFB para preservar as preparações, que foram secas com vento quente, fixadas com metanol absoluto (Vetec) por 1 min e coradas com Giemsa (Dinâmica) a 10% em tampão para coloração, pH 7,2 por 15 min. As lamínulas foram lavadas com água e montadas em lâminas com resina sintética (Entelan®).

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

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

3.3.6. Expressão de corpúsculos lipídicos detectada pela coloração com óleo vermelho O quando os monócitos foram estimulados com eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* tratados ou não com os antimaláricos.

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

Os procedimentos de aderência dos monócitos, tratamento com antimaláricos e estímulo dos monócitos pela fagocitose dos eritrócitos parasitados foram realizados conforme descrito para a fagocitose. Ao fim do processo de fagocitose as preparações foram lavadas e as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, por 30 min, lavadas duas vezes com STF, pH 7,2 e uma vez com álcool isopropílico a 60%. Em seguida, as células foram coradas por 15 min com uma solução de óleo vermelho O filtrado uma vez em filtro de 0,45µm e duas vezes em filtro 0,22 µm e preparada no momento do uso, a partir de uma solução estoque a 0,5%, sendo três partes da solução estoque para duas partes de água Milli Q. O excesso de corante foi retirado e as escavações foram lavadas uma vez com 1 mL de álcool isopropílico a 60% e depois duas vezes com 1 mL de água Milli Q. Os núcleos celulares foram corados com hematoxilina de Carazzi por 5 min, lavadas novamente com água Milli Q e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro sobre uma fina camada de meio de montagem gelatinoso (10 g de gelatina, 60 mL de água destilada, 70 mL de glicerol e 0,25 g de fenol).

O procedimento de coloração dos corpúsculos lipídicos com óleo vermelho foi realizado em duplicata para cada tratamento e controle e as preparações foram quantificadas em microscópio ótico. Os corpúsculos lipídicos foram identificados como estruturas circulares que se coram em vermelho no citoplasma dos monócitos. Para cada lâmina foram contadas

200 células e foram estabelecidas a quantidade média de corpúsculos dentro de cada monócito (MCL), a porcentagem de monócitos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma (M%) e o índice corpuscular (IC) que é a expressão da MCL multiplicada pelo M% (Adaptado de Borges, 2013).

3.3.7. Influência das drogas antimaláricas cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a produção *in vitro* de óxido nítrico após incubação dos monócitos com eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum*

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

O sangue periférico foi coletado e as CMN foram separadas por centrifugação em Percoll a 750 g por 15 min a 4°C. As CMN recuperadas eram ressuspensas em 10 mL de STF gelada e centrifugadas 1 vez a 400g por 10 min, a 4°C, para retirar o Percoll. O sobrenadante era desprezado e as células ressuspensas novamente em 10 mL de STF gelado e, centrifugado a 200g, por 10 minutos, a 4°C, para retirar as plaquetas. A viabilidade era determinada pela exclusão da nigrosina e foi sempre superior a 95%. As CMN ($1,5 \times 10^5/200\mu\text{l}$ por escavação) eram incubadas em RPMI 1640 incompleto (Sigma) contendo 2,67 mL/L de bicarbonato de sódio a 7,5% (pH 7,2), a 37°C, por 1 h, para permitir aderência dos monócitos. As preparações em triplicata eram tratadas ou não com as drogas antimaláricas cloroquina, primaquina e sulfato de quinina, nas mesmas concentrações acima referidas e incubadas por 1 hora ou não. Após, foram aspirados os sobrenadantes e acrescentados os eritrócitos parasitados (1×10^6) ou não parasitados por 30 min, a 37°C, 5% de CO₂. Após 24 h de incubação, 100 μl dos sobrenadantes eram acrescentados ao reagente de Greiss (1-38 N naftiletileno diamina dihidroclorido) a 0,1 %, sulfanilamida a 1% e H₃PO₄ a 25 %, e a reação era lida em espectrofotômetro de placa (Spectramax plus

384 - Molecular Devices), em 540 nm e os resultados foram expressos como $\mu\text{M NO}_2$ (Green e cols., 1981; Muniz-Junqueira e cols, 2005).

A curva padrão foi feita pela diluição seriada do nitrito de sódio (NaNO_2) nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, correspondendo respectivamente, 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,12 μM e 1,56 μM .

3.3.8. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio utilizamos a técnica da oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase após incubação dos monócitos com eritrócitos infectados ou não com *Plasmódio falciparum* e tratados ou não com as drogas antimalárica

Para avaliar a produção de H_2O_2 , utilizamos a técnica da oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. Os monócitos foram obtidos por centrifugação em gradiente de Percoll e mantidos à 4°C até o momento da utilização. Os monócitos ($1,5 \times 10^5$) eram distribuídos em placas de 96 poços de fundo chato, em triplicata, em 200 μl de RPMI incompleto. As placas eram incubadas por 1 hora em câmara úmida, à 37°C em 5% de CO_2 em ar para permitir a aderência das células. Após esse período, as escavações eram lavadas 2 vezes com 200 μl de STF 37° e em seguida, eram adicionados 200 μl das drogas individualmente ou meio RPMI 1640, nas concentrações já citadas e novamente incubadas em câmara úmida, à 37°C com 5% de CO_2 em ar por 1h. Após esse período o sobrenadante era aspirado e incubado com 1×10^6 eritrócitos infectados ou não com *P. falciparum* em 200 μl de RPMI completo com 10% de pool de soro humano inativado. As placas eram incubadas em câmara úmida, à 37°C com 5% de CO_2 em ar por 30 min. Após esse período, as escavações eram lavadas 3 vezes com 200 μl de STF à 37°C e eram adicionados 140 μL de tampão fosfato suplementado com 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho de fenol e 19 unidades por mL de peroxidase tipo II (Sigma), e a placa era

incubada novamente por mais 60 min em câmara úmida, a 37°C em ambiente com 5% de CO₂ em ar. Após esse período, a reação era interrompida pela adição de 10µl de NaOH 1N e, em seguida, a placa era lida em espectrofotômetro de placa (Spectramax Plus 384, Molecular Devices) com filtro de 620nm. Uma curva padrão para quantificação do H₂O₂ (Merck) era preparada nas concentrações de 100µM, 50µM, 25µM, 12,5 µM, 6,25µM, 3,12µM, 1,56µM e 0µM com vermelho de fenol acrescido de peroxidase tipo II, correspondente às diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128.

3.4. Análise estatística

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

A normalidade ou não das variáveis nas amostras foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a variância da amostra pelo teste de Bartlett. Para comparação entre duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste t pareado e para aquelas que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para amostras independentes foram utilizados o teste t ou o teste de Mann-Whitney quando a comparação era feita entre duas amostras. Para as amostras com mais de duas variáveis o teste Anova foi utilizado para aquelas que tinham distribuição normal e quando não normal, o teste Kruskal Wallis.

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% ($p < 0,05$).

Os dados foram expressos graficamente como mediana, quartis e extremos.

RESULTADOS

4.1. Influência do tratamento de monócitos de indivíduos normais e/ou dos eritrócitos infectados com *P. falciparum* com cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina, sobre a capacidade fagocitária

A influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com as drogas antiplasmódio cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre a capacidade fagocitária dos monócitos foi investigada pelo teste de fagocitose em placa.

Avaliou-se a fagocitose por meio de dois tipos de receptores: a mediada por receptores para padrões moleculares associados a patógenos, quando os parasitos foram incubados com soro fetal bovino inativado e a mediada por receptores para opsoninas, quando os parasitos foram incubados com plasma fresco do doador.

A capacidade fagocitária foi expressa por meio do índice fagocitário, da média de parasitos interiorizados pelo monócito e da proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose. Essa expressão também foi avaliada para as diferentes partículas fagocitadas: anel, esquizonte e hemozoína.

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

Fagocitose total

O tratamento dos monócitos e dos eritrócitos infectados com a cloroquina por 1 hora diminuiu a mediana do Índice fagocitário dos monócitos de 9,4 para 7,8 ($p=0,031$, teste de Wilcoxon). Isso ocorreu pelo menor envolvimento dos monócitos na fagocitose 9,4 x 7,8 ($p=0,031$, teste de Wilcoxon), pois não houve alteração do número de eritrócitos parasitados ingeridos pelos monócitos ($p>0,01$), (FIGURA 2A, D E G).

Quando somente os eritrócitos infectados foram tratados com a cloroquina por 1 h houve diminuição da mediana do índice fagocitário de 9,4 para 6,402 ($p=0,05$, Wilcoxon), o que se repetiu quando avaliamos a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose (FIGURA 2B E H). Não houve influência da cloroquina sobre a mediana do número de eritrócitos ingeridos por monócito (FIGURA 2D, E, H).

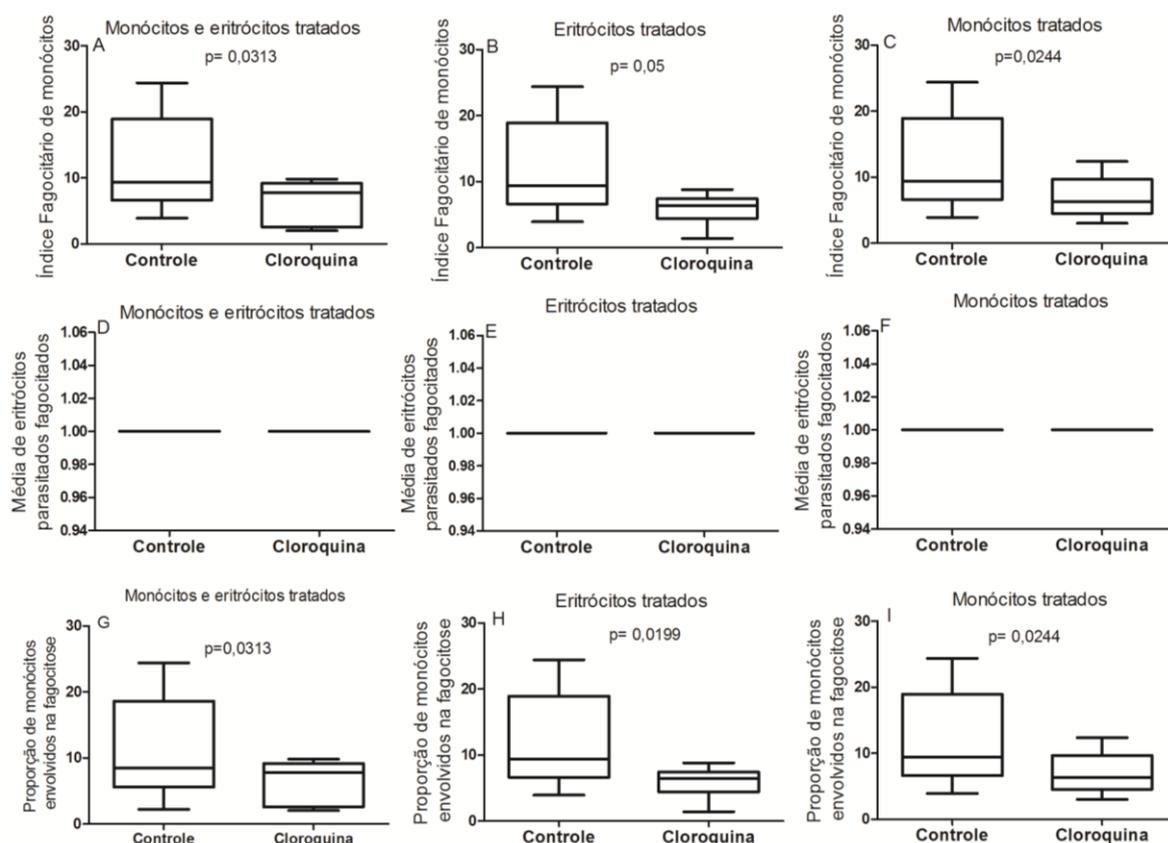


Figura 2. Influência da cloroquina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados sensibilizados com soro humano fresco. (A, B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

Discriminação da fagocitose das formas em anel, e esquizonte do plasmódio e hemozoína quando os eritrócitos parasitados foram tratados com a cloroquina

Quando a análise foi feita considerando as formas de desenvolvimento do parasita, anel e esquizonte e os restos de hemozoína, individualmente, observamos que apenas para os esquizontes houve

diminuição significativa nas medianas do IF e da proporção de monócitos envolvidos na sua ingestão, que foi de 0,4 para 0 ($p=0,0224$, Mann Whitney), quando somente os eritrócitos foram tratados por 1 h (FIGURA 4B E H).

Quando somente os monócitos receberam tratamento por 1 h com a cloroquina, não houve alteração na mediana do índice fagocitário e nem na proporção de monócitos envolvidos na fagocitose. Também não houve influência sobre a mediana do número de eritrócitos infectados ingeridos por monócitos. Esses resultados repetiram-se quando monócitos e eritrócitos foram tratados simultaneamente por 1 h (FIGURAS 3, 4 E 5).

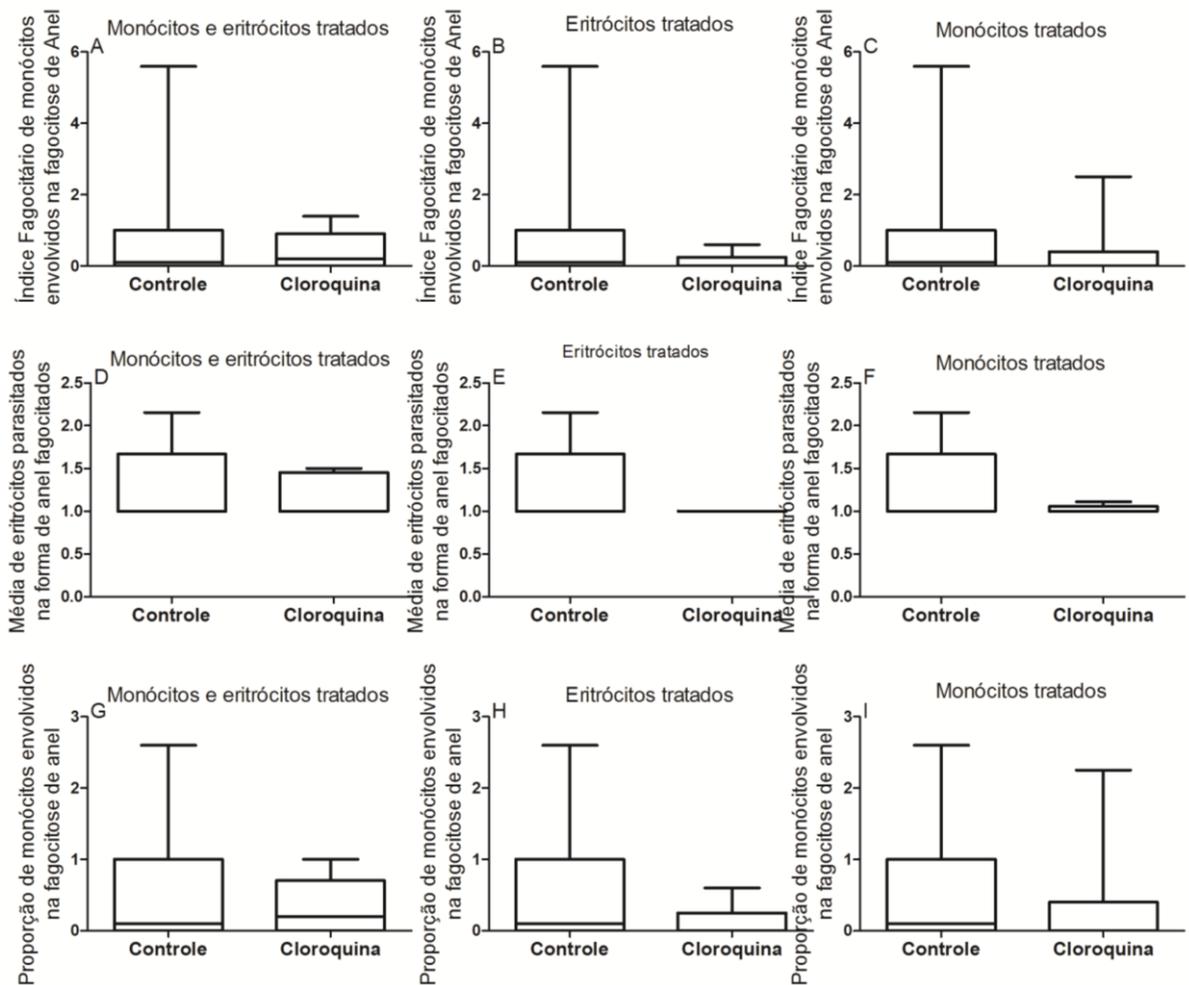


Figura 3. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel sensibilizadas com soro humano fresco. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

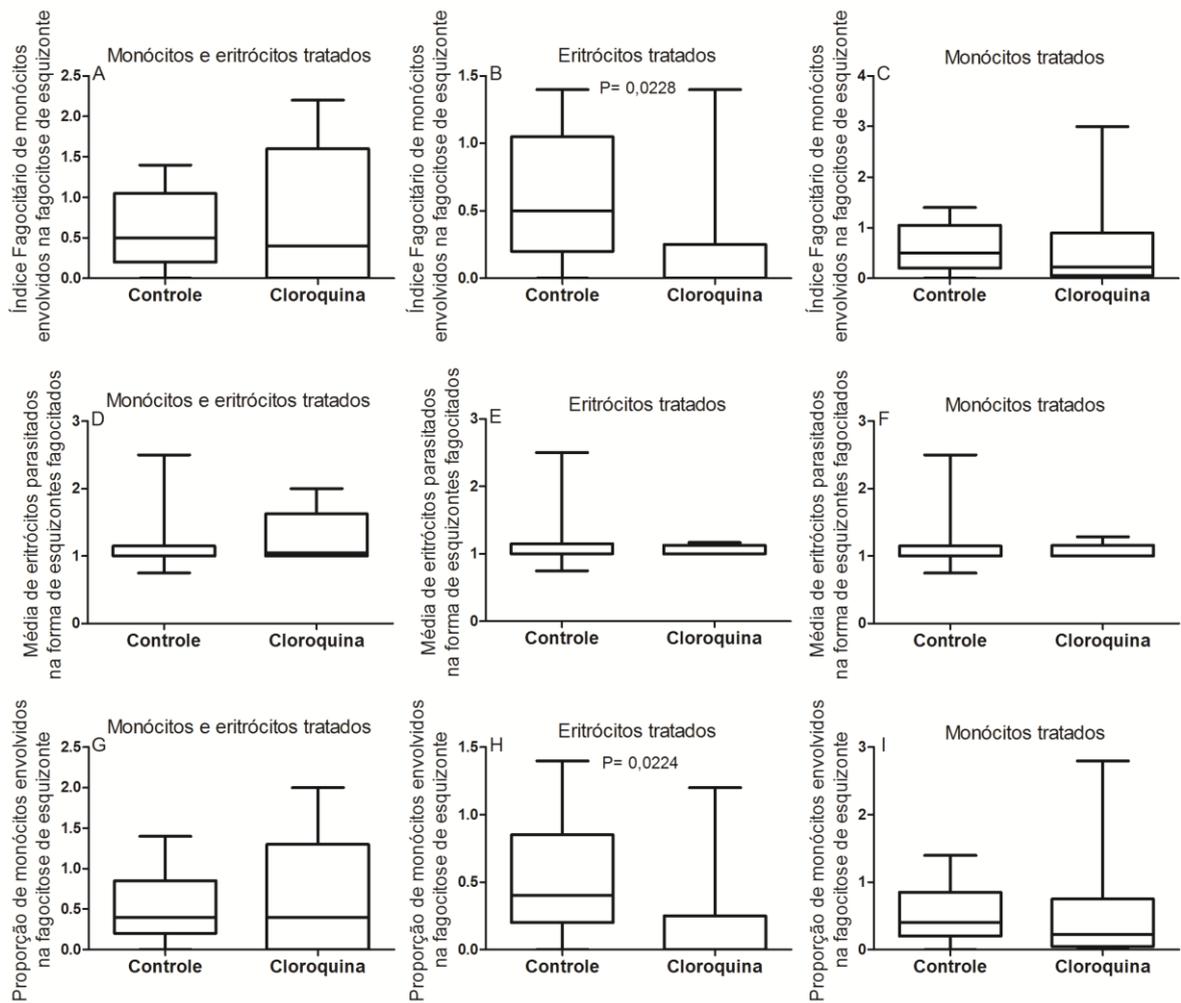


Figura 4. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte sensibilizadas com soro humano fresco. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

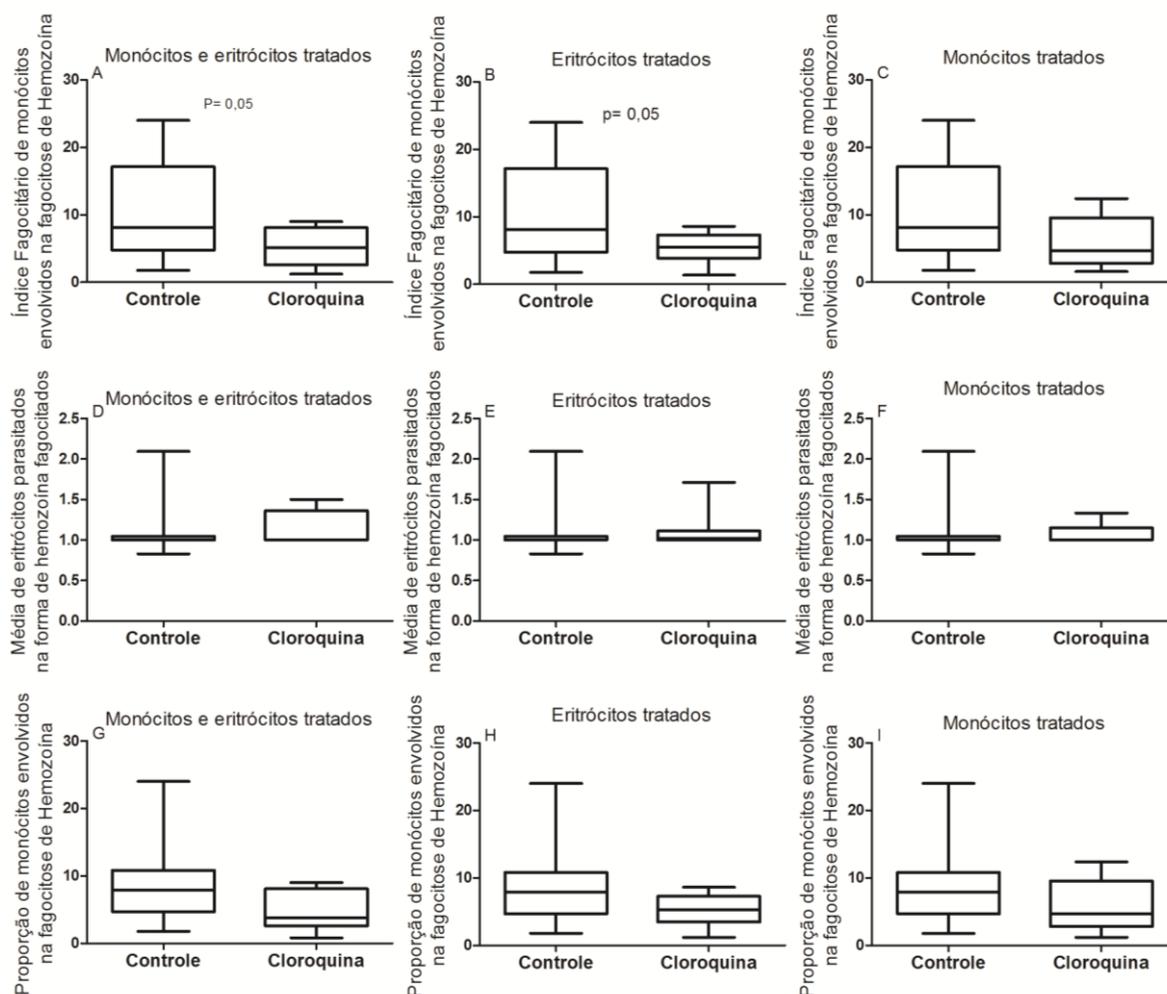


Figura 5. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas hemozoína sensibilizadas com soro humano fresco. (A, B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G, H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.3 Influencia do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais e/ou de eritrócitos infectados com *P. falciparum* com cloroquina sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.

Fagocitose total

O tratamento com a cloroquina não modificou estatisticamente nenhum dos parâmetros avaliados quando testamos a fagocitose total (FIGURA 6).

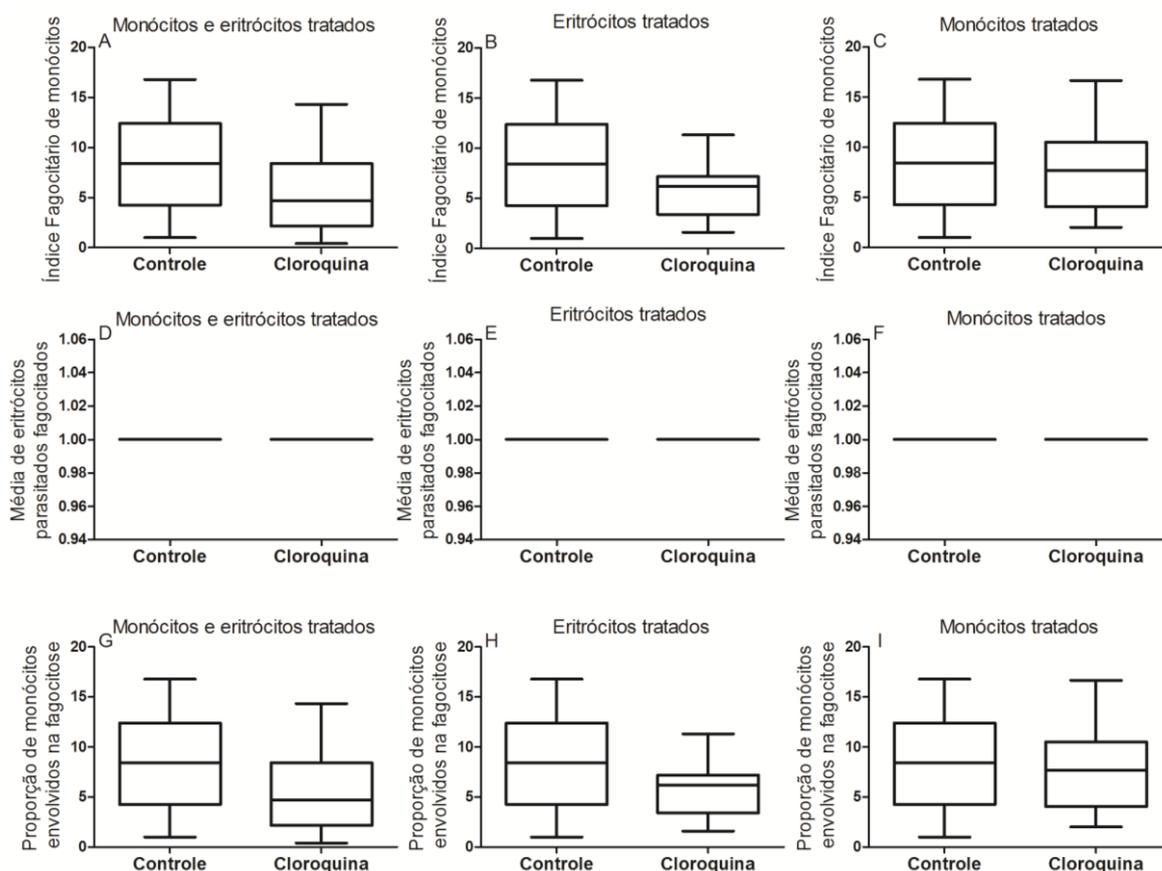


Figura 6. Influência da cloroquina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados não sensibilizados. (A, B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito (G, H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

Discriminação da fagocitose das formas em anel e esquizonte do plasmódio e hemozoína quando os eritrócitos parasitados foram tratados com a cloroquina

No grupo onde os eritrócitos foram tratados por 1h e analisada a fagocitose das formas em esquizonte, observamos diminuição significativa nas medianas do IF e da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, que foi de 0,4 para 0 ($p=0,0198$, teste Mann Whitney). Figura 8B e H.

Nenhum outro parâmetro analisado e nenhuma outra forma do parasito individualmente analisada sofreu influência significativa da cloroquina (FIGURAS 7, 8 e 9).

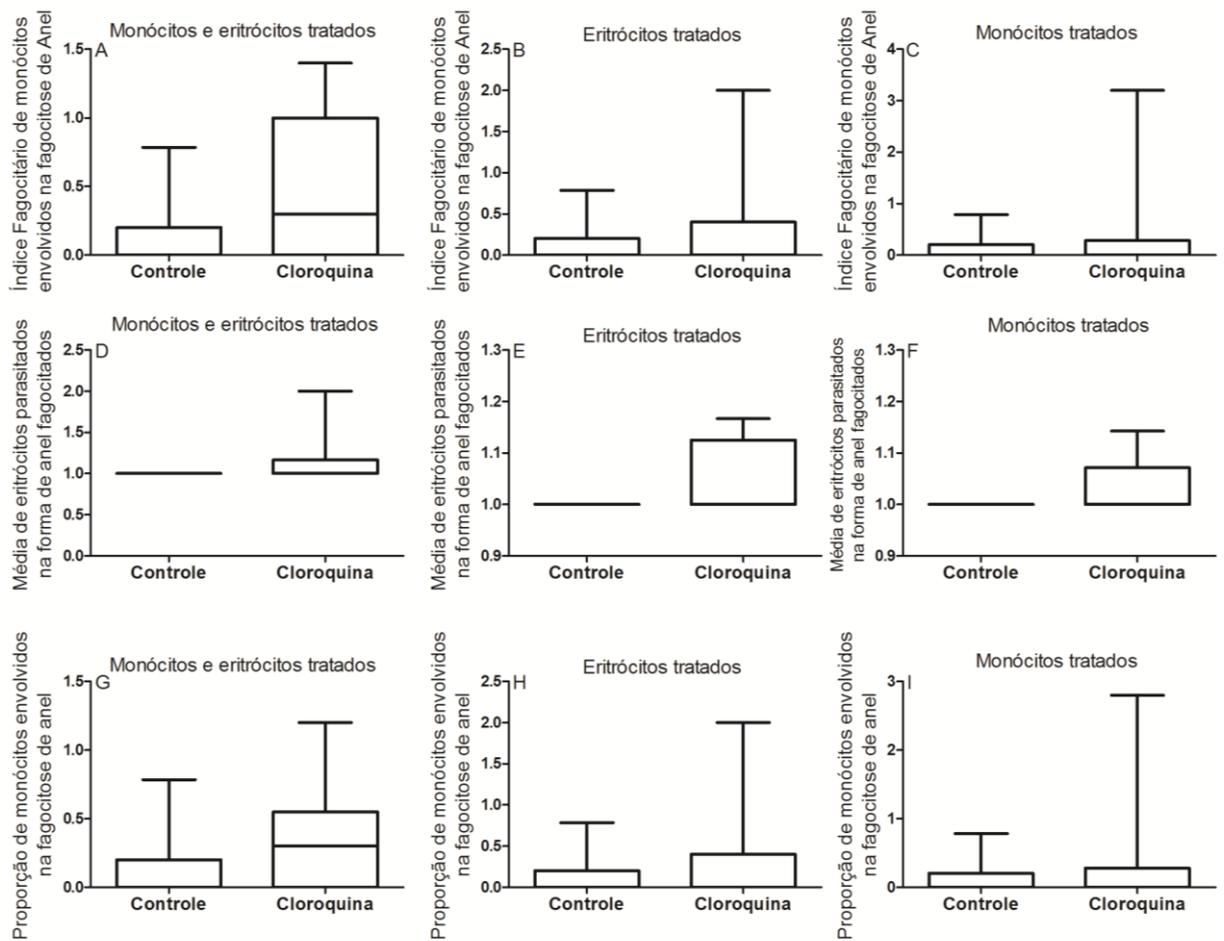


Figura 7. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel não sensibilizadas. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

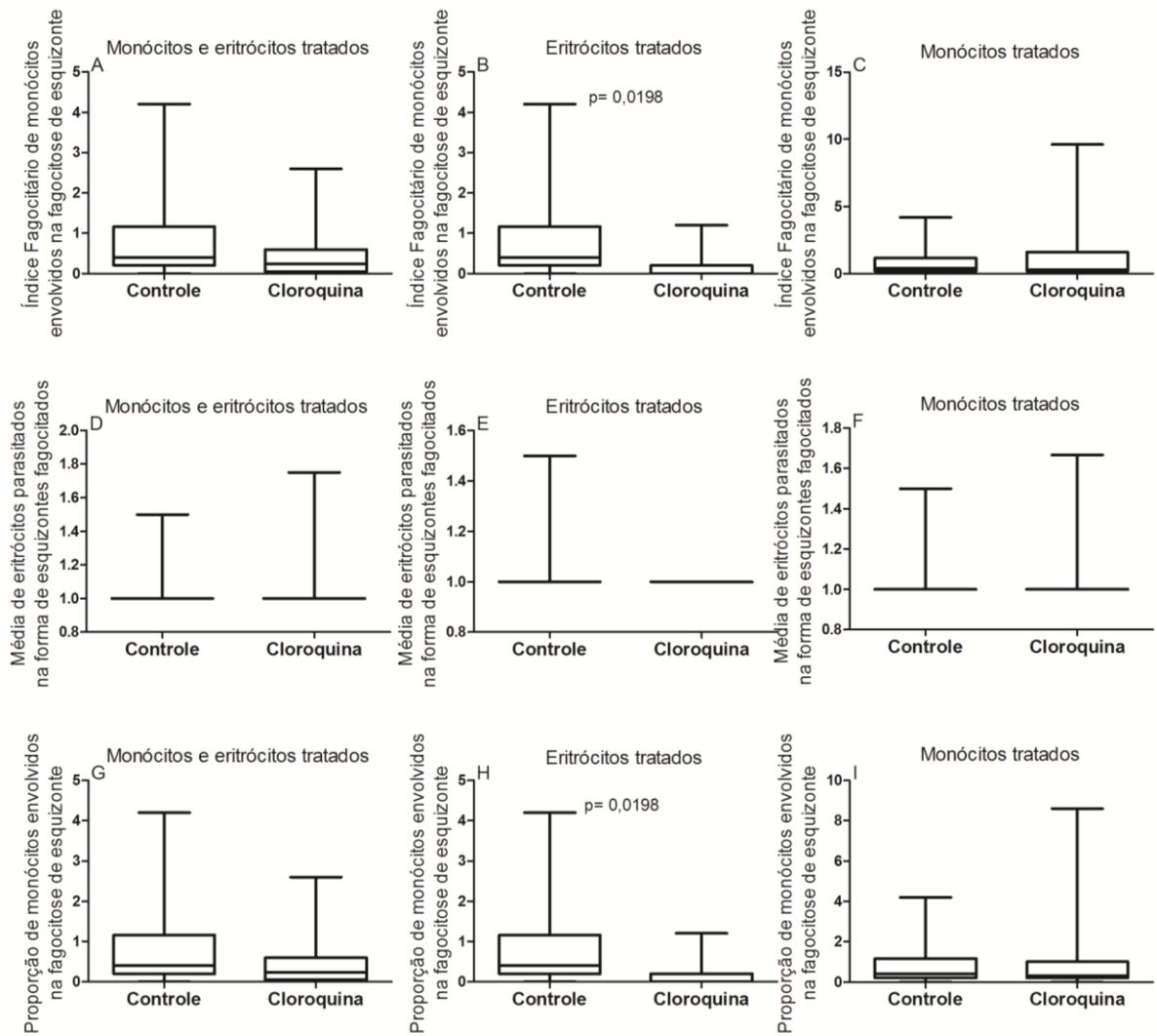


Figura 8. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte não sensibilizadas. (A, B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G, H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

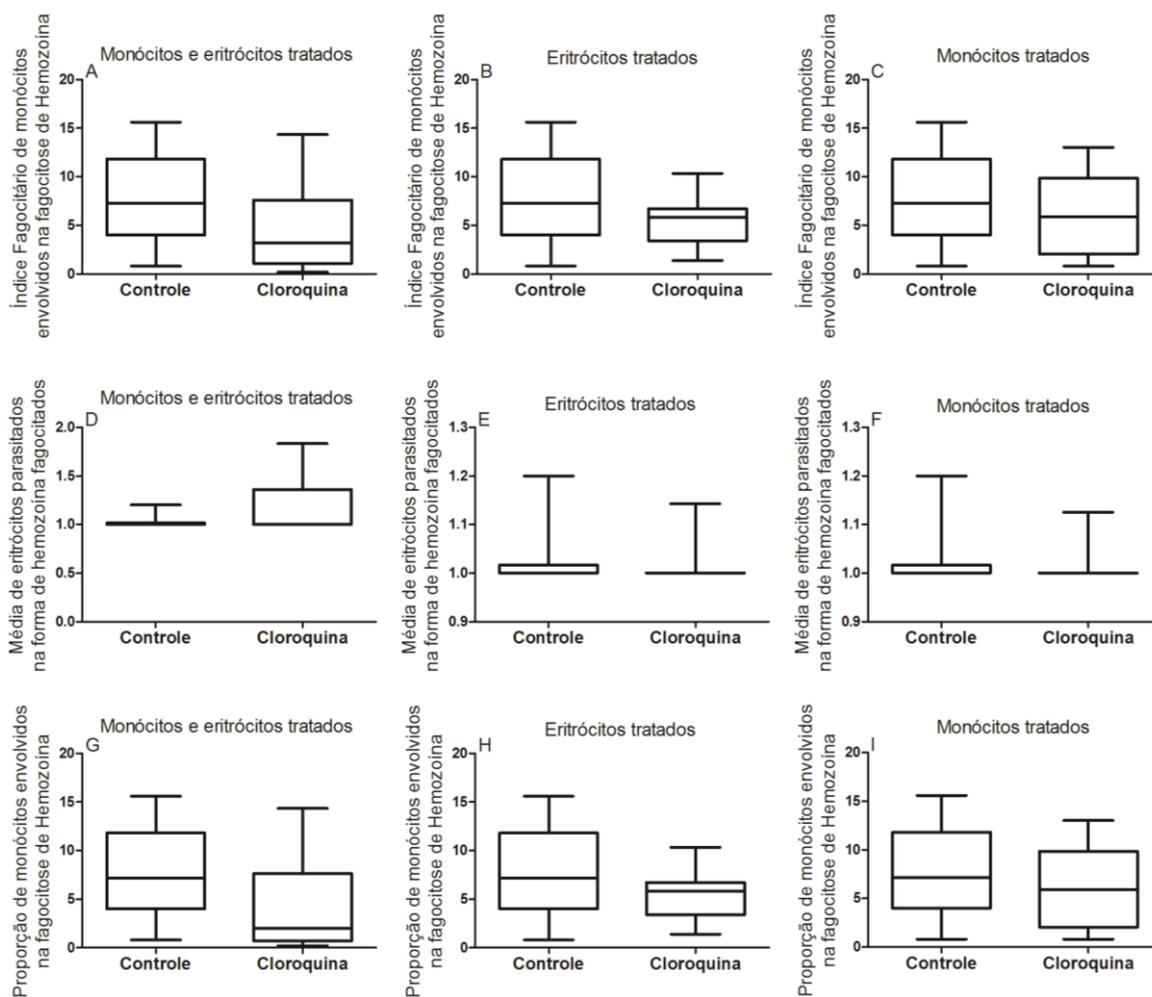


Figura 9. Influência da cloroquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em hemozoína não sensibilizadas. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

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

Fagocitose total

O tratamento dos monócitos e dos eritrócitos infectados com a primaquina por 1 h diminuiu a mediana do índice fagocitário dos monócitos ($p=0,05$, teste Mann Whitney), e diminuiu a mediana da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,0153$, teste Mann Whitney) e não

influenciou a mediana do número de eritrócitos infectados interiorizados por monócitos (FIGURA 10A, D e G).

A primaquina não influenciou a fagocitose quando apenas os monócitos ou eritrócitos foram tratados (FIGURA 10B, C, E, F, H e I).

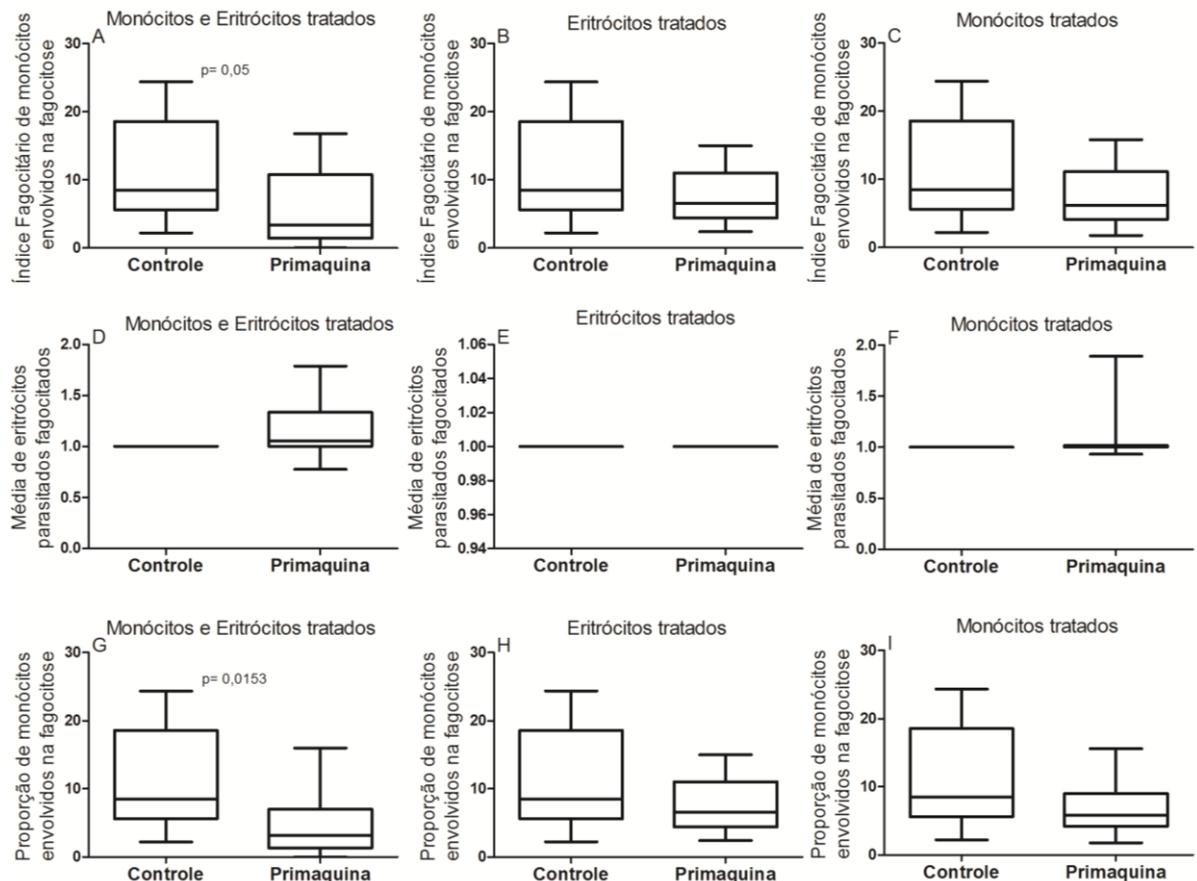


Figura 10. Influência da primaquina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados sensibilizados com soro humano fresco. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

Discriminação da fagocitose das formas em anel e esquizonte do plasmódio e hemozoína quando os eritrócitos parasitados foram tratados com a primaquina

Quando foi feito o tratamento dos monócitos com a primaquina, houve diminuição do índice fagocitário e da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose das formas em anel de 0,1 para 0,0 (p=0,03, teste Mann

Whitney), (FIGURA 11B e I). Nos grupos onde os monócitos e os eritrócitos foram tratados simultaneamente, observamos diminuição do IF e da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose dos restos de hemozoína de 8,1 para 2,9 ($p= 0,05$, teste t), (FIGURA 13A).

Não houve influência do tratamento com a primaquina sobre a fagocitose das outras formas do parasito (FIGURAS 11, 12 e 13).

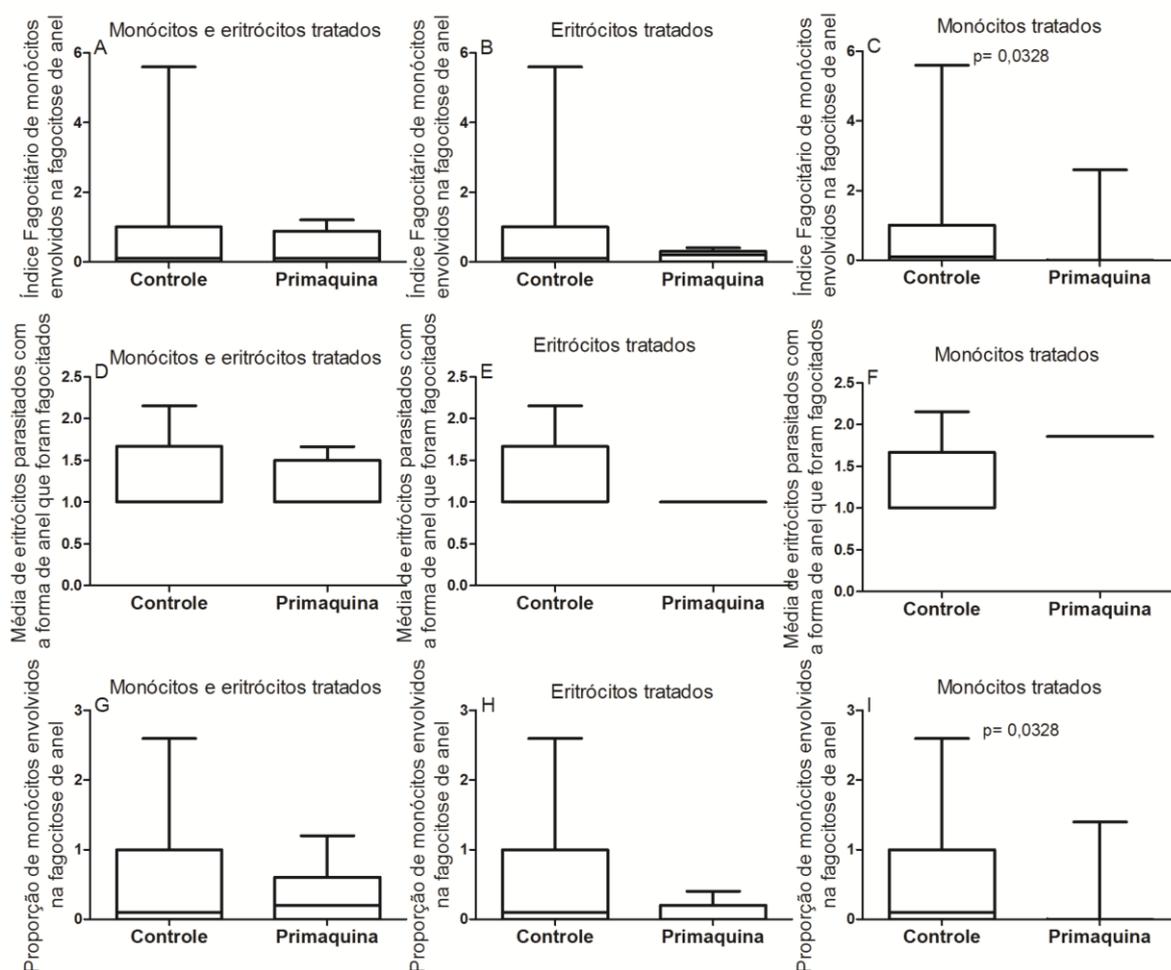


Figura 11. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel sensibilizadas com soro humano fresco. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

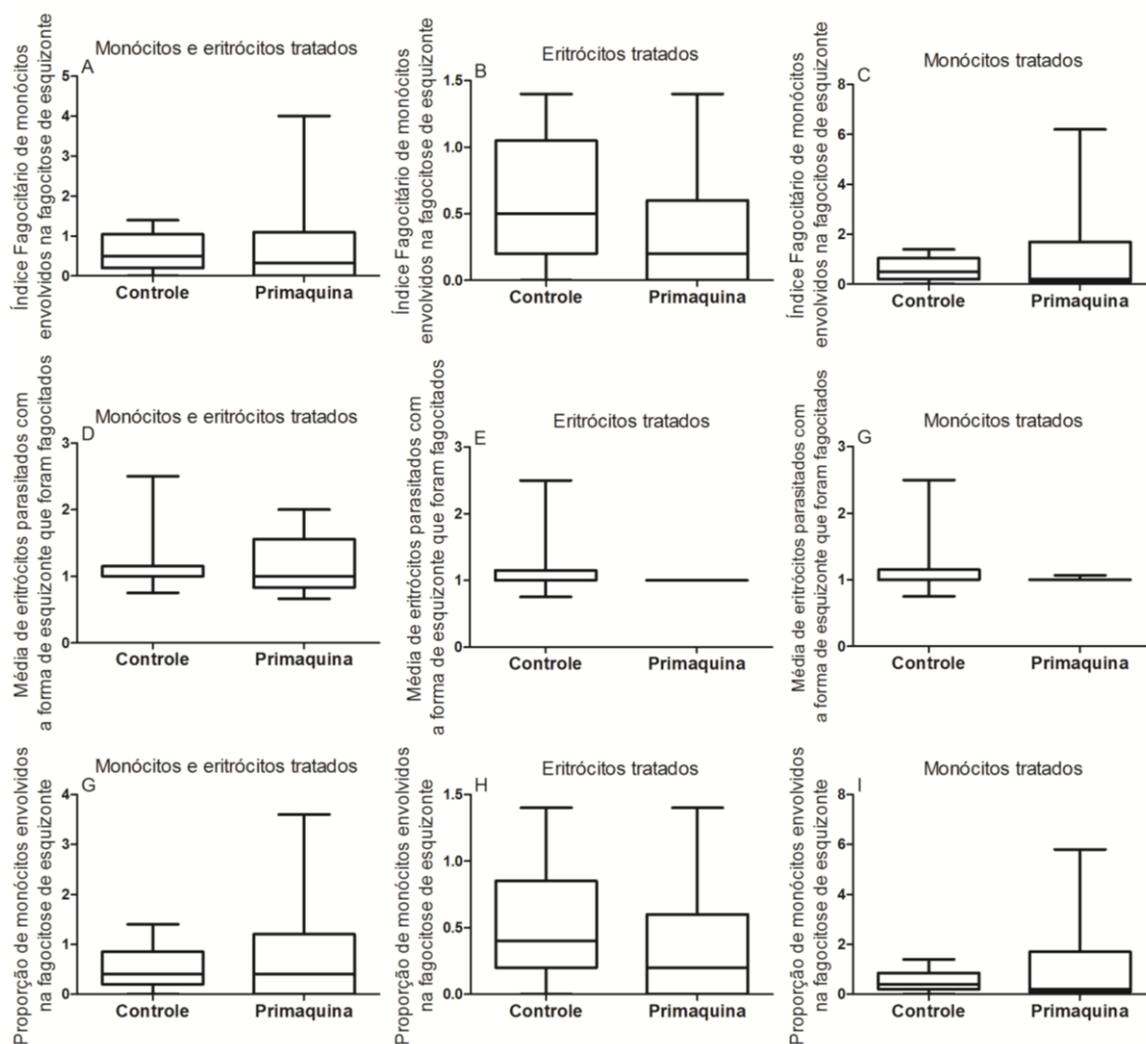


Figura 12. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte sensibilizadas com soro humano fresco. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

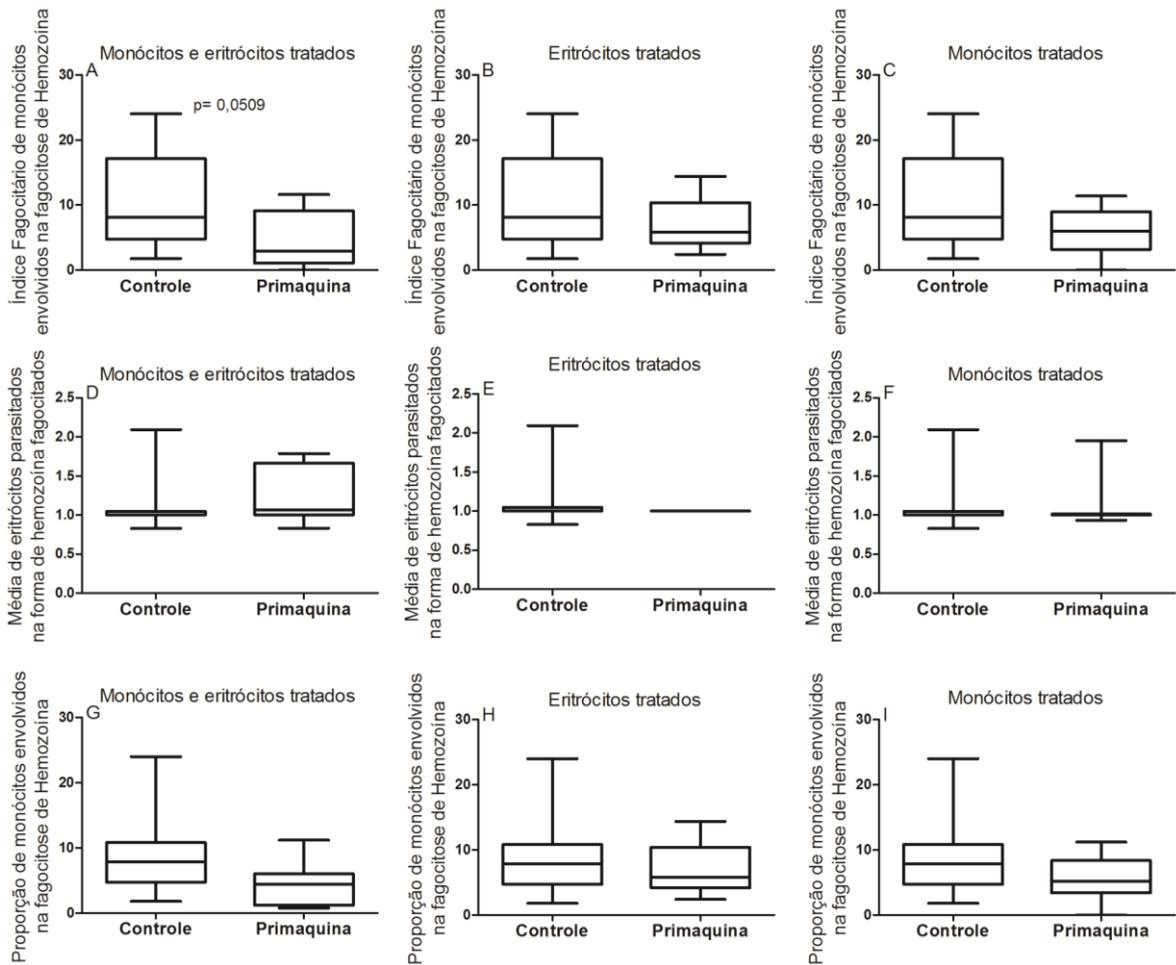


Figura 13. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em hemozoína sensibilizadas com soro humano fresco. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.5 Influencia do tratamento *in vitro* com a primaquina de monócitos de indivíduos normais e/ou de eritrócitos infectados com *P. falciparum* sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos

Fagocitose geral

O tratamento dos monócitos e dos eritrócitos infectados com a primaquina por 1 h diminuiu a mediana do índice fagocitário dos monócitos de 8,4 para 5,0 ($p=0,0179$, teste t). Isso ocorreu pelo menor envolvimento dos monócitos na fagocitose $8,4 \times 4,6$ ($p=0,0148$, teste t), pois não houve

alteração do número de eritrócitos parasitados ingeridos pelos monócitos (Figura 14A, D e G).

Quando somente os eritrócitos infectados ou os monócitos foram tratados individualmente com a primaquina por 1 h não houve influência sobre os parâmetros analisados (FIGURA 14B, C, E, F, H e I).

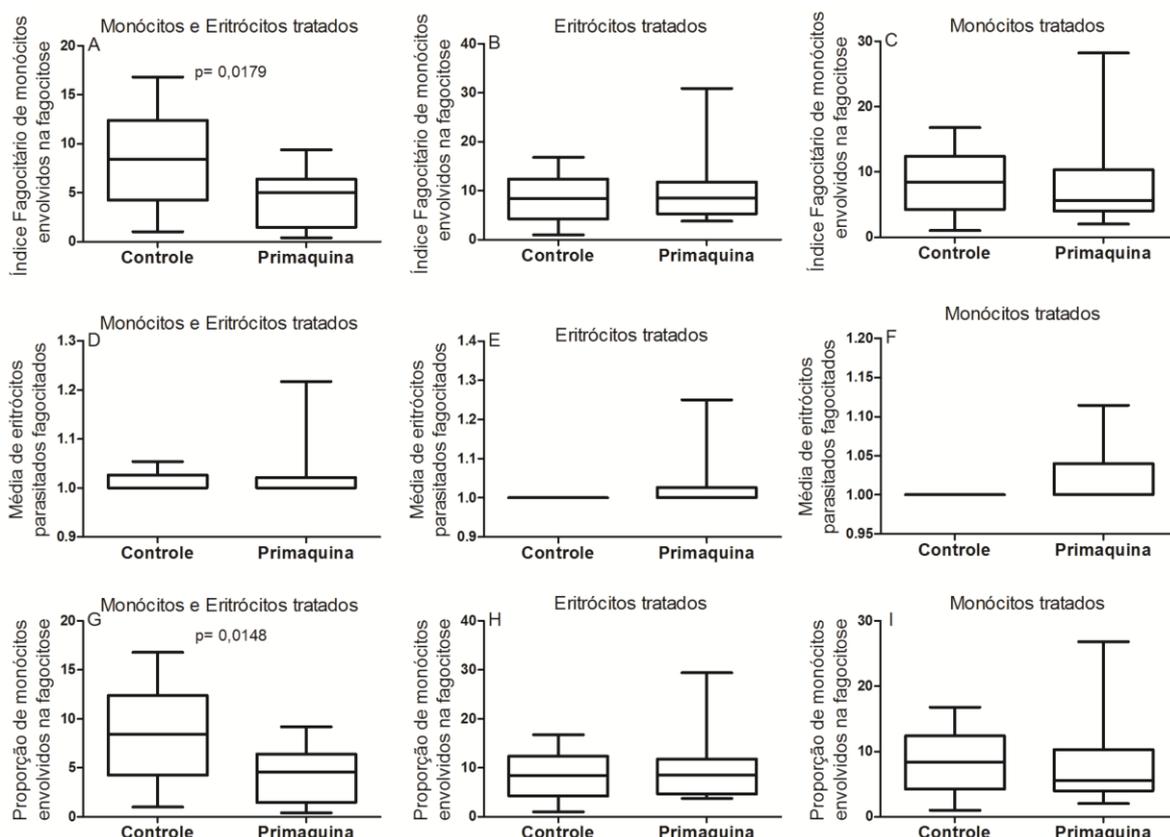


Figura 14. Influência da primaquina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados não sensibilizados. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito (G, H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

Discriminação da fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos das formas em anel e esquizonte do plasmódio e hemozoína quando os eritrócitos parasitados foram tratados com a primaquina

Quando os monócitos e eritrócitos foram tratados com a primaquina, houve diminuição do IF de 7,2 para 1,0 ($p=0,007$, teste t) e da proporção de

monócitos que fagocitaram hemozoína de 7,1 para 1,0 ($p=0,01$, teste Mann Whitney), (FIGURA 17A e G).

Não houve diferença estatística na fagocitose das outras formas do parasito (FIGURAS 15, 16 e 17).

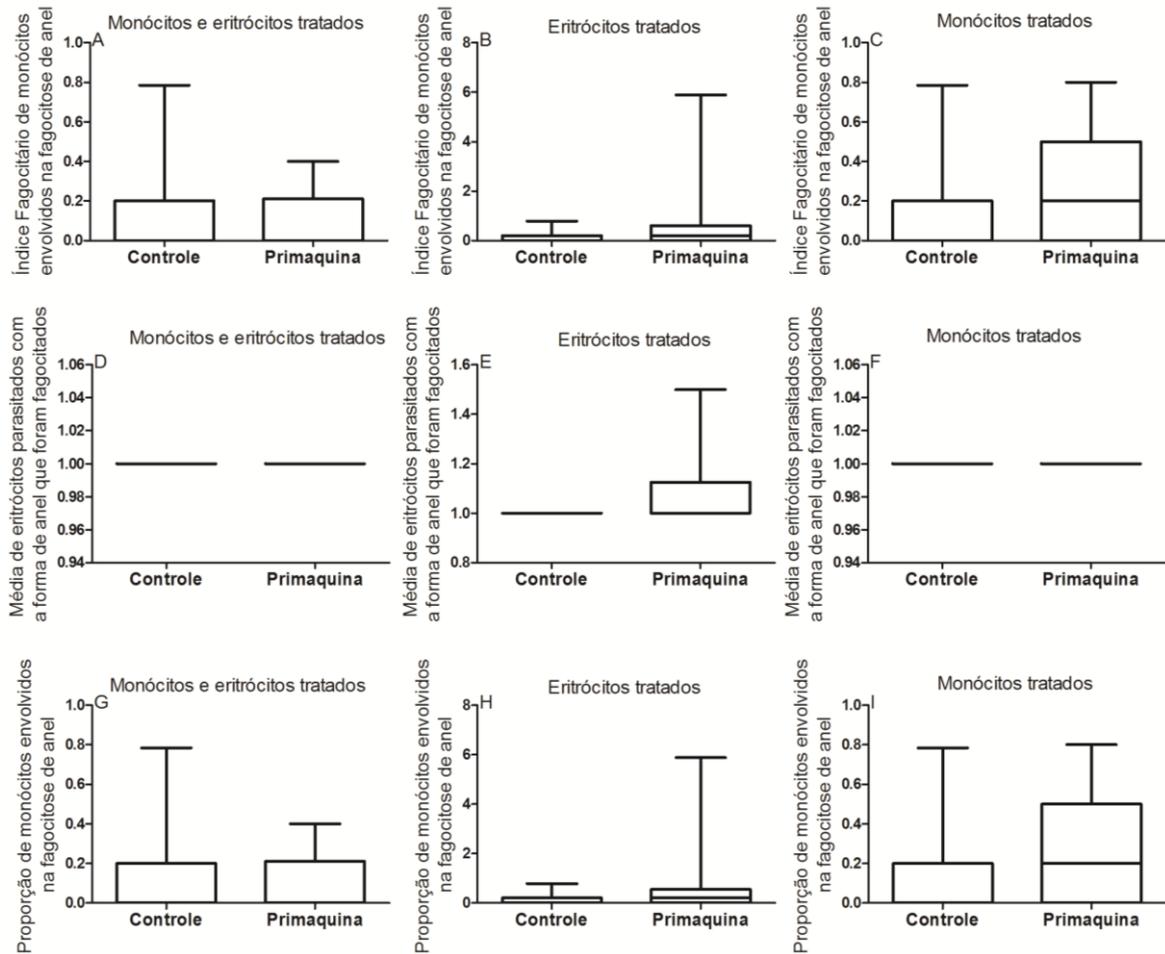


Figura 15. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel não sensibilizadas. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

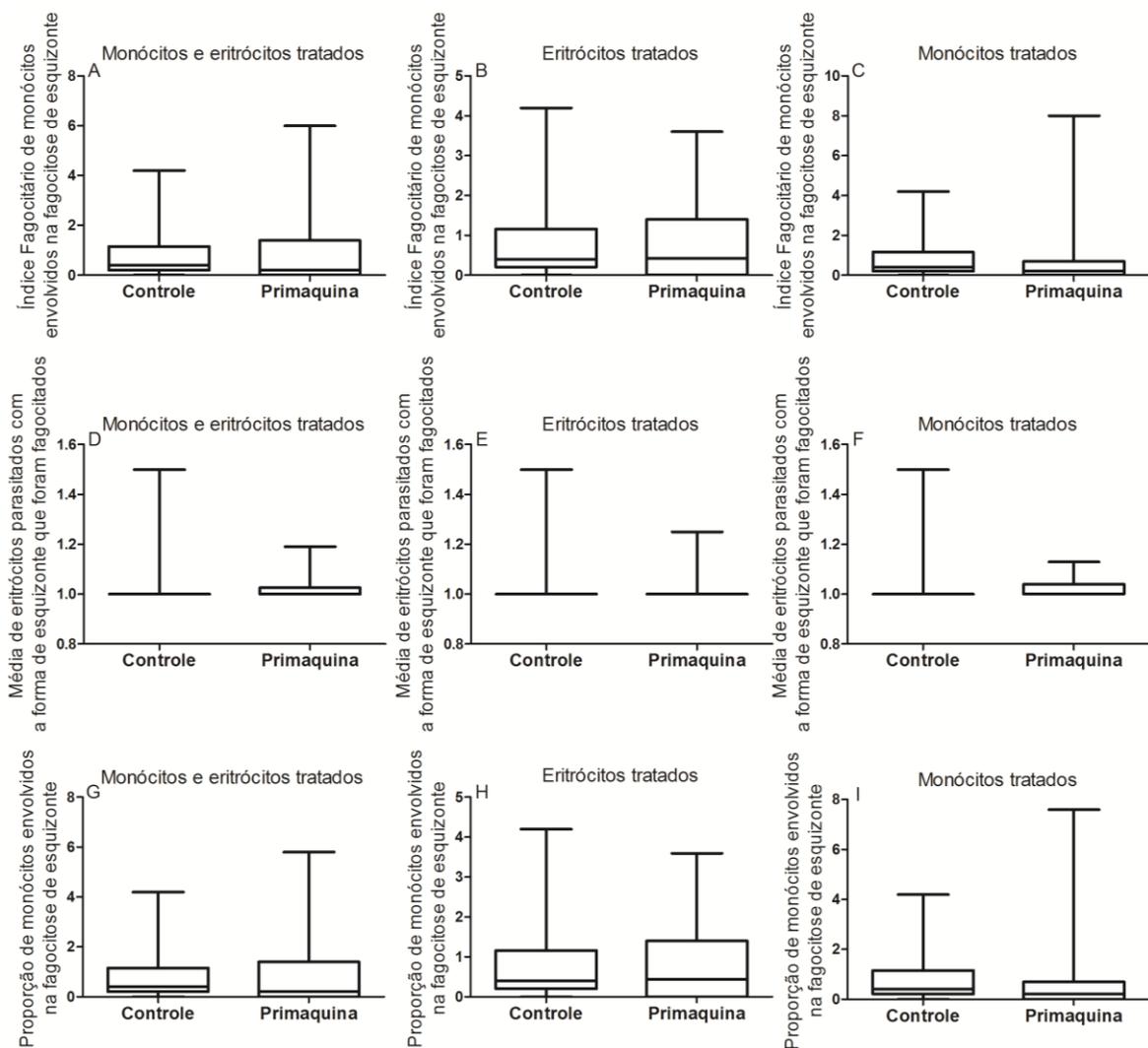


Figura 16. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte não sensibilizadas. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

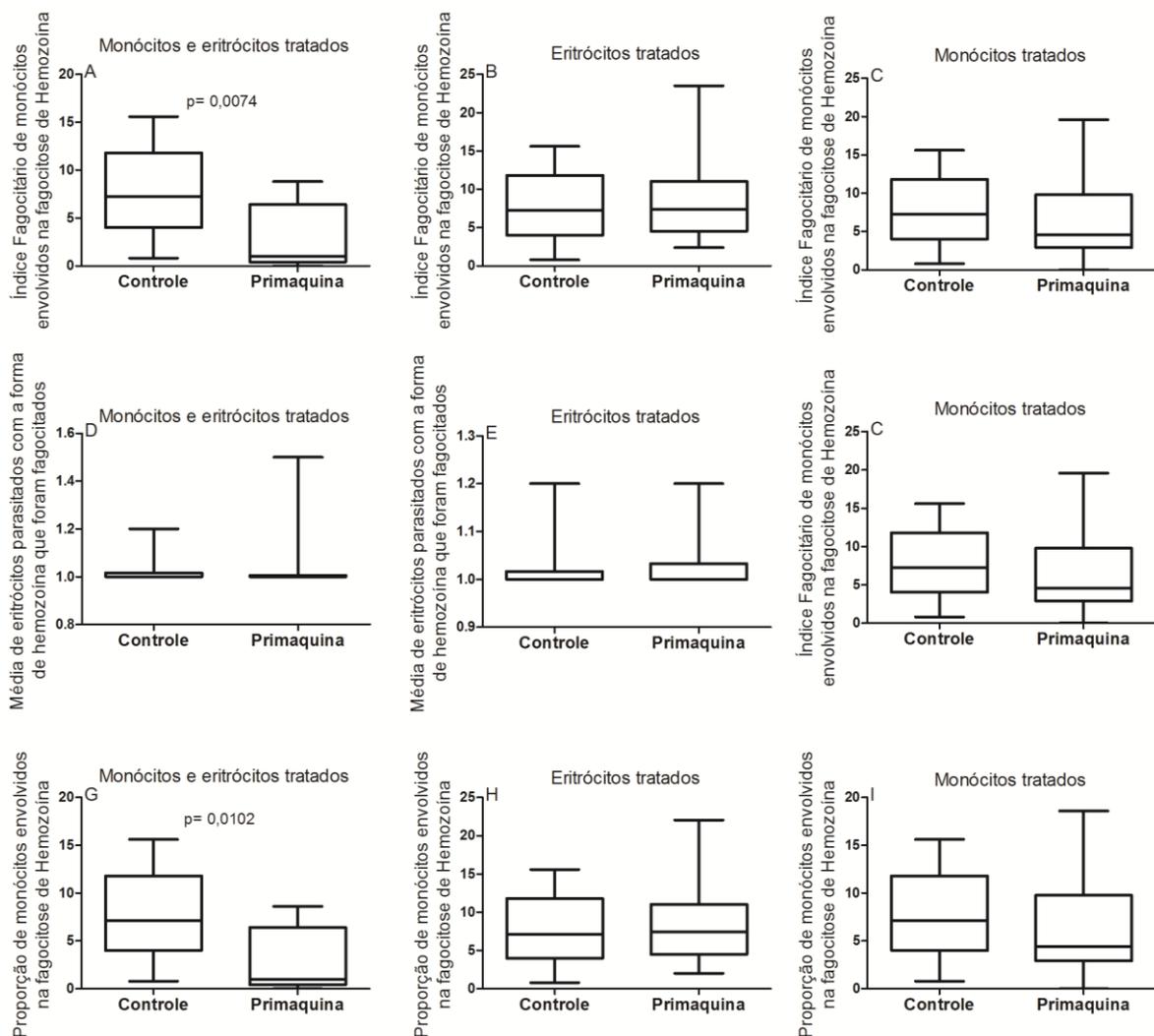


Figura 17. Influência da primaquina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em hemozoína não sensibilizadas. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.6 Influencia do tratamento *in vitro* com o sulfato de quinina de monócitos de indivíduos normais e/ou de eritrócitos infectados com *P. falciparum* sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas

Fagocitose total

O tratamento com o sulfato de quinina não modificou nenhum dos parâmetros avaliados quando testamos a fagocitose total (FIGURA 18).

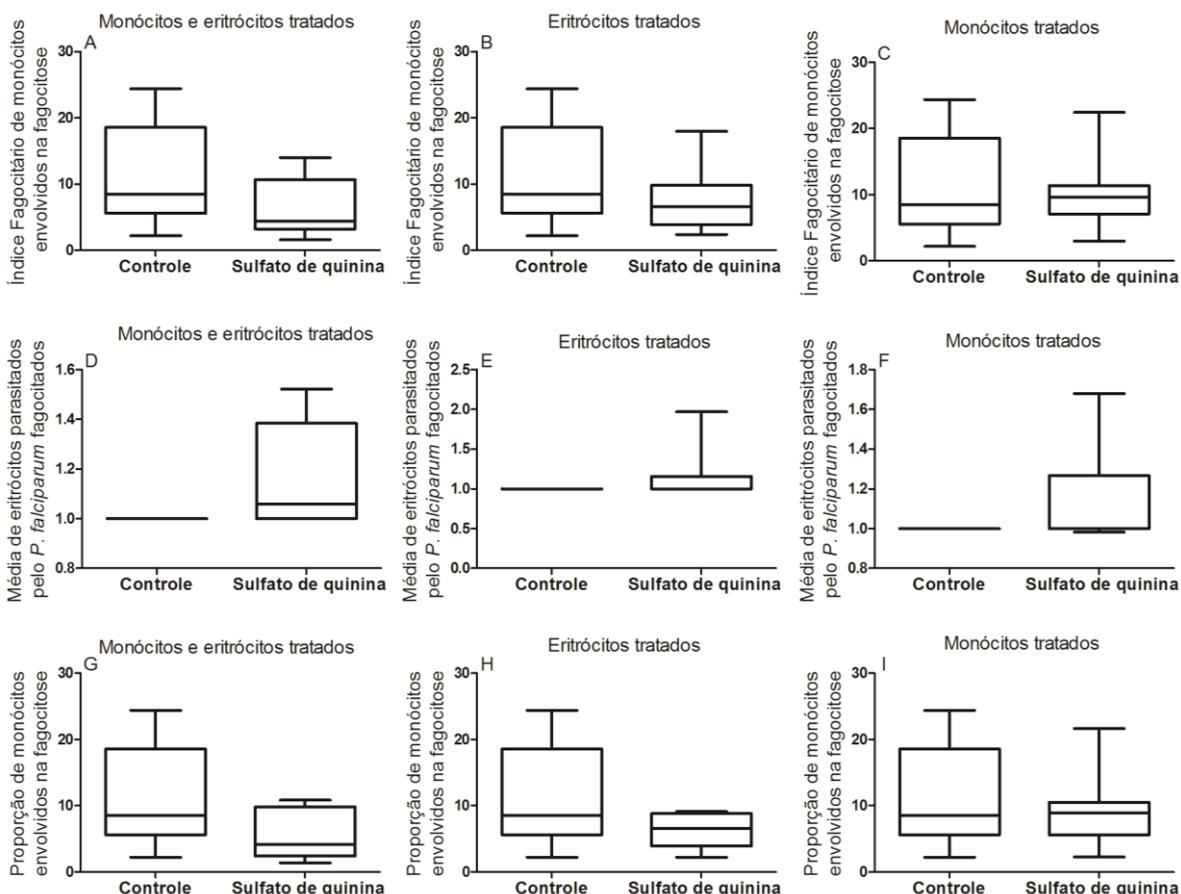


Figura 18. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados sensibilizados com soro humano fresco. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

Discriminação da fagocitose das formas em anel e esquizonte do plasmódio e hemozoína quando os eritrócitos parasitados foram tratados com a primaquina

O tratamento dos monócitos e eritrócitos concomitantemente diminuiu a mediana do IF dos monócitos que fagocitaram hemozoína de 8,1 para 3,9 ($p= 0,04$, teste t), (FIGURA 21A). Nenhum outro tratamento influenciou na fagocitose das outras formas do parasito (FIGURAS 19, 20 e 21).

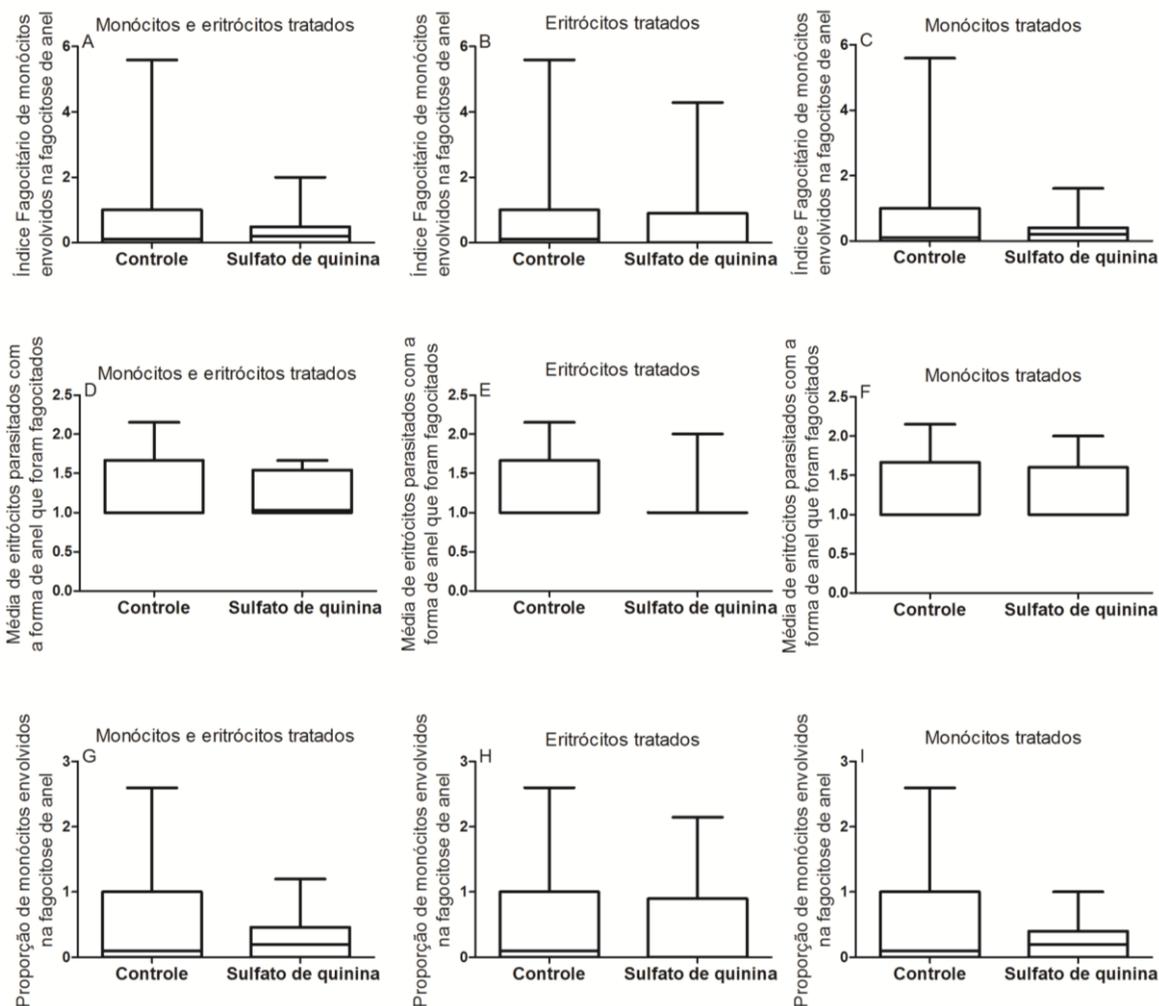


Figura 19. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel sensibilizadas com soro humano fresco. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

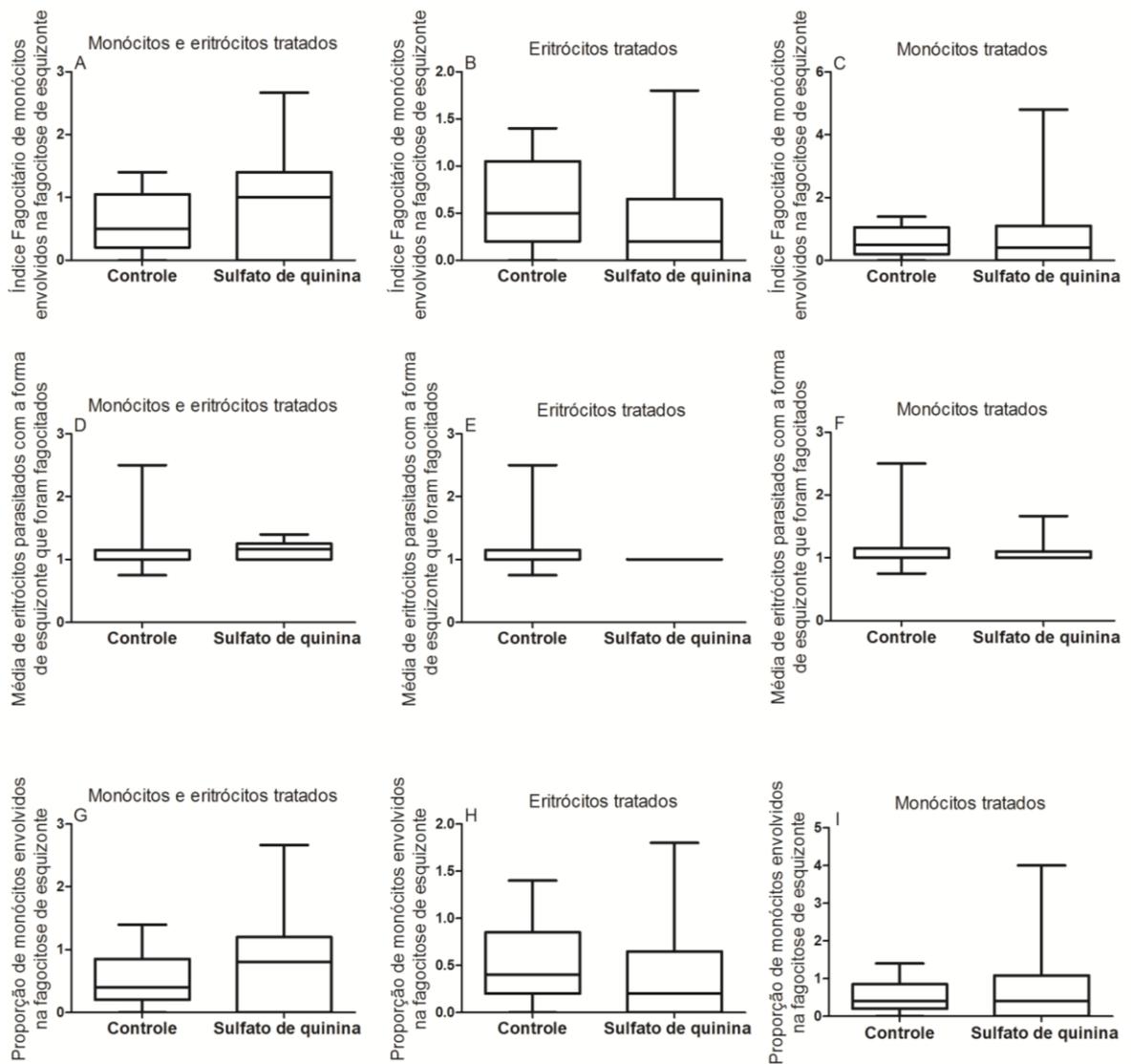


Figura 20. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte sensibilizadas com soro humano fresco. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

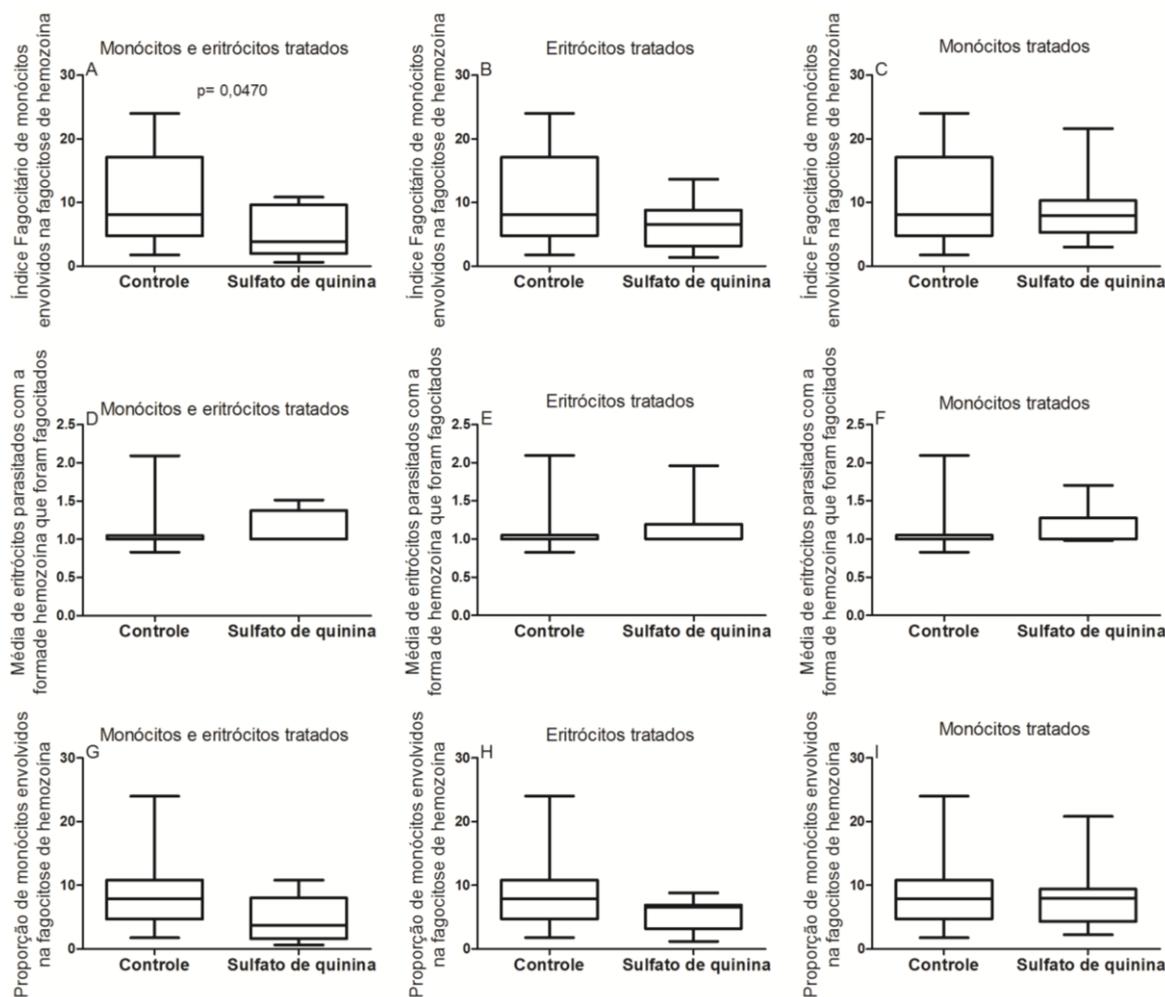


Figura 21. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em hemozoína sensibilizadas com soro humano fresco. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.7 Influencia do tratamento *in vitro* com o sulfato de quinina de monócitos de indivíduos normais e/ou de eritrócitos infectados com *P. falciparum* sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos

Fagocitose total

O tratamento dos monócitos e dos eritrócitos infectados com o sulfato de quinina por 1 h diminuiu a mediana do índice fagocitário dos monócitos de 8,4 para 5,6 ($p=0,04$, teste t), como também diminuiu a mediana da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de 8,4 para 5,0 ($p= 0,04$,

teste t) e aumentou a mediana do número de eritrócitos infectados interiorizados por monócitos (FIGURA 22A, D e G).

O sulfato de quinino não alterou a fagocitose quando somente os eritrócitos infectados foram tratados (FIGURA 22B, E e H).

Quando somente os monócitos foram tratados por 1 h com a sulfato de quinina, observou-se diminuição do índice fagocitário de 8,4 pra 5,6 ($p=0,02$, teste t) e da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de 8,4 para 4,8 ($p=0,02$ teste t) e aumentou da ingestão dos eritrócitos parasitados por monócito ($p=0,03$, teste t, com correção de Welch's), (FIGURA 22C, F e I).

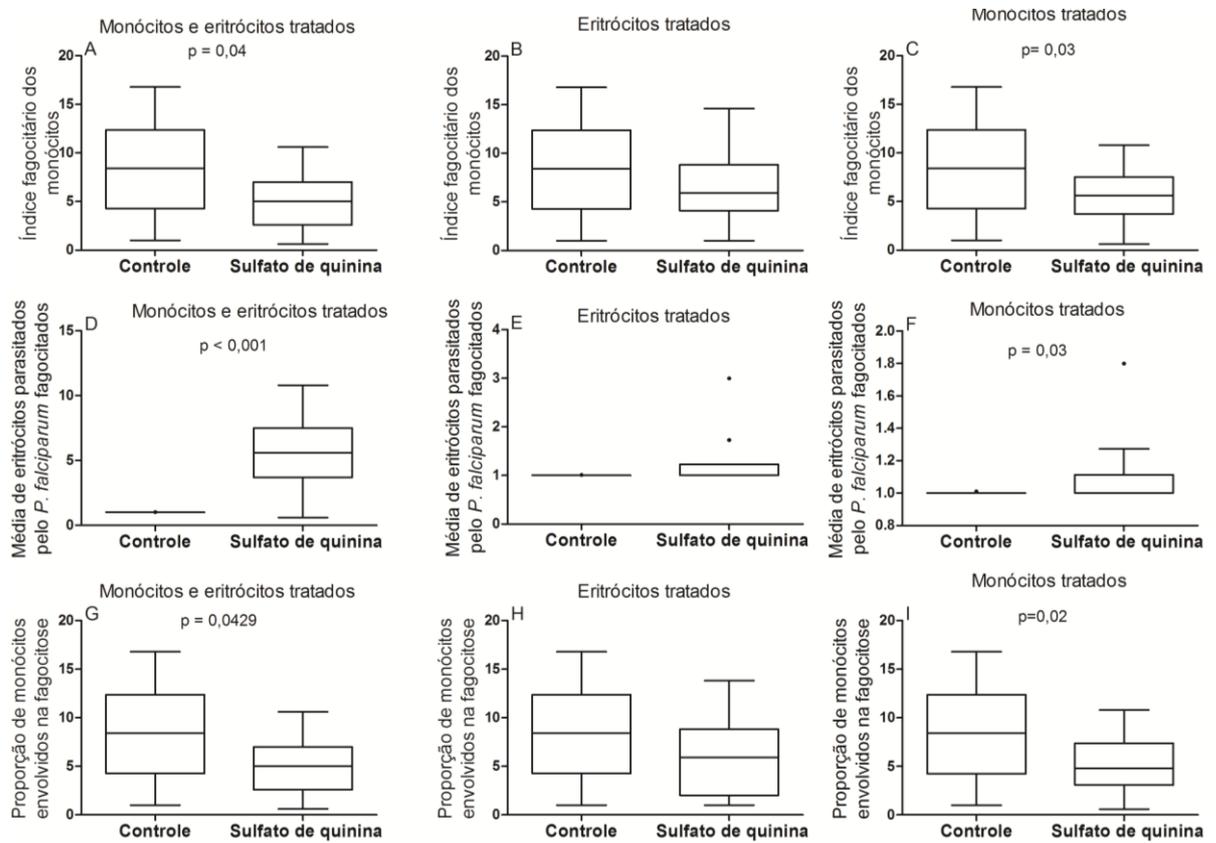


Figura 22. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose total de eritrócitos parasitados não sensibilizados. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose

Discriminação da fagocitose das formas em anel e esquizonte do plasmódio e hemozoína quando os eritrócitos parasitados foram tratados com o sulfato de quinina

Quando somente os monócitos foram tratados por 1 h com o sulfato de quinina houve diminuição da mediana do IF para hemozoína de 7,2 para 4,2 ($p=0,02$, teste t) e da proporção dos monócitos envolvidos na fagocitose de 7,1 para 3,7 ($p=0,02$, teste t), mas não modificou a mediana do número de eritrócitos infectados com hemozoína ingeridos por monócito (FIGURA 25C, F e I).

A fagocitose das outras formas do parasito não foram alteradas pelo tratamento com a droga (FIGURAS 23, 24 e 25).

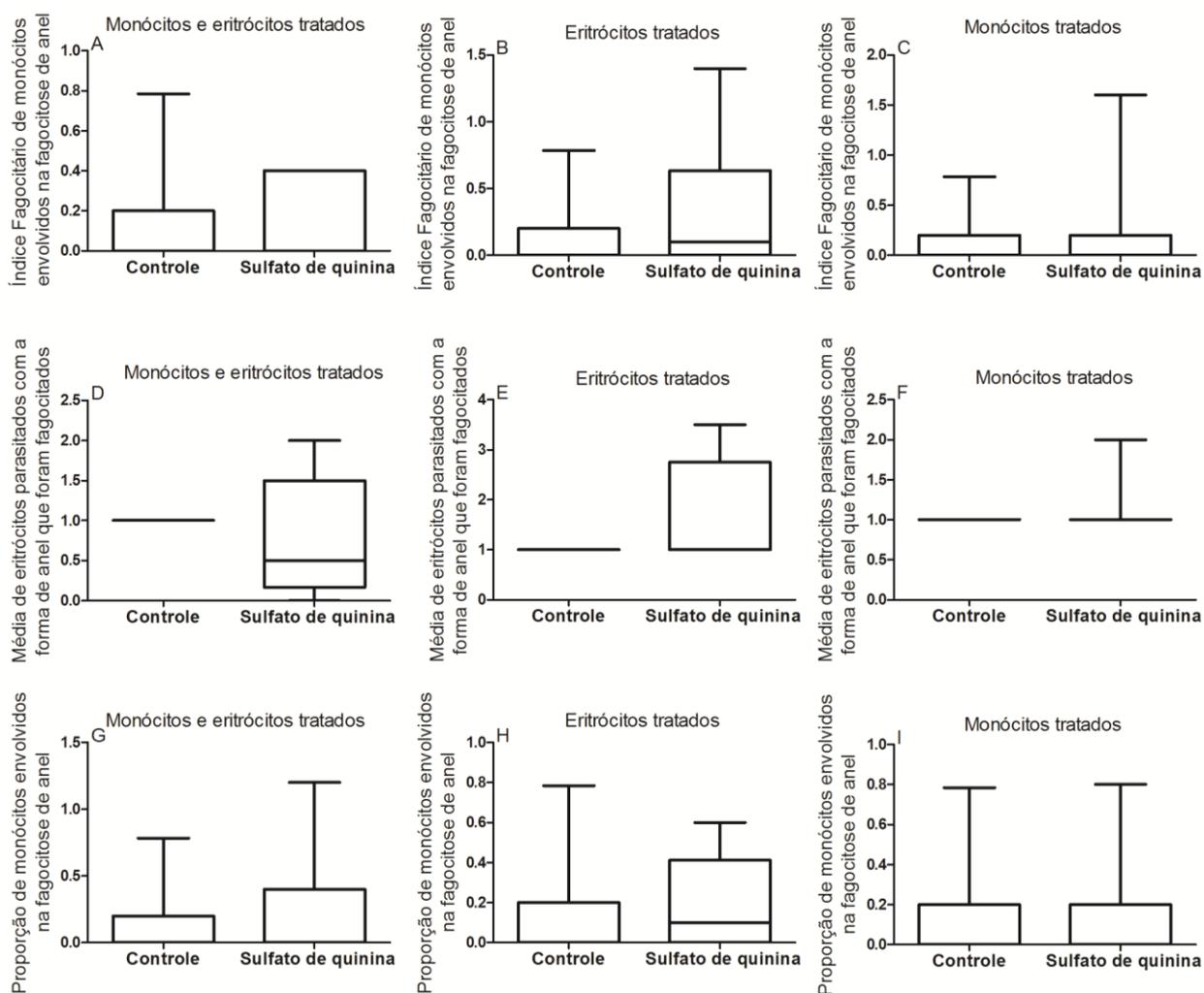


Figura 23. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em anel não sensibilizadas. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

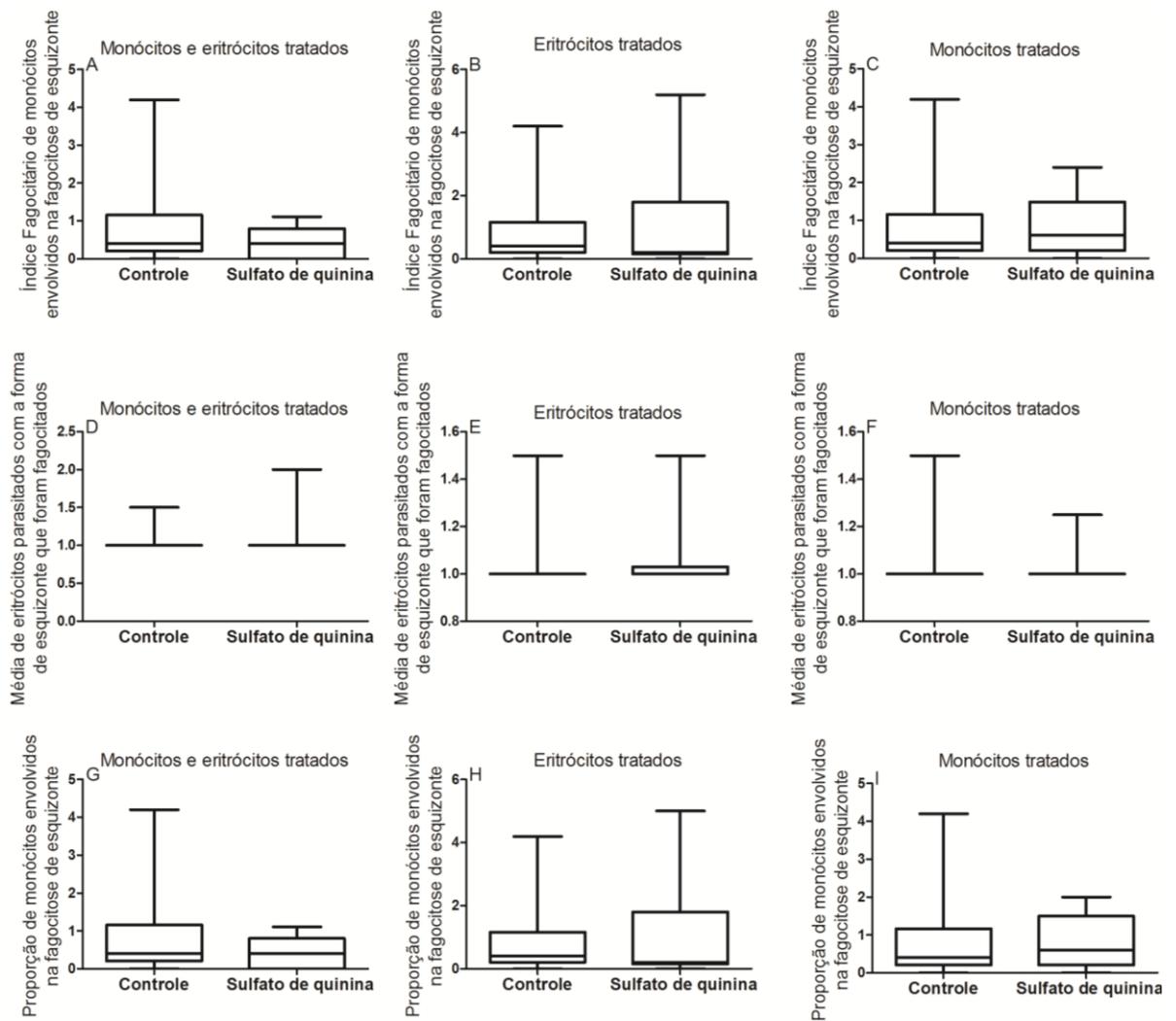


Figura 24. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em esquizonte não sensibilizada. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

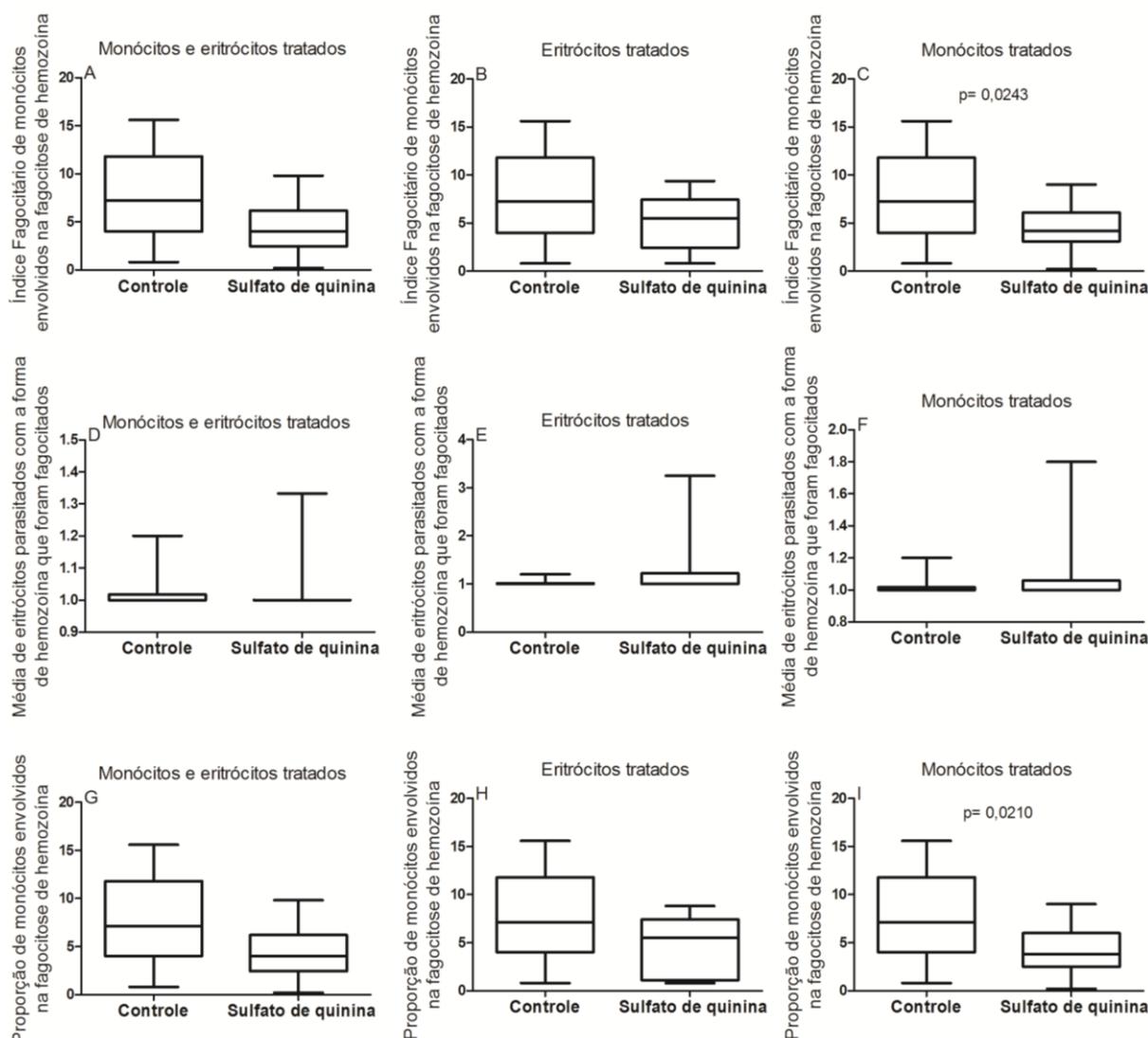


Figura 25. Influência do sulfato de quinina sobre a fagocitose dos eritrócitos parasitados com as formas em hemozoína não sensibilizadas. (A,B,C) Índice fagocitário (D,E,F) Média de eritrócitos parasitados fagocitados por monócito. (G,H,I) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose.

4.8. Corpúsculos Lipídicos

4.8.1. Influencia do tratamento *in vitro* com a cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos estimulados pelos receptores para opsoninas com eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum*

A quantificação de corpúsculos lipídicos nos monócitos humanos foi feita após a estimulação com eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* sensibilizados com o soro humano fresco. A expressão dos corpúsculos lipídicos foi representada pelo número médio corpúsculos expresso por monócito expressando corpúsculo lipídico.

Quando os monócitos foram tratados com a primaquina e estimulados pelos receptores para opsoninas, houve aumento somente da mediana do número corpúsculos lipídicos expressos por monócito de 2,3 para 4,4 ($p=0,0242$, teste t), (FIGURA 26E).

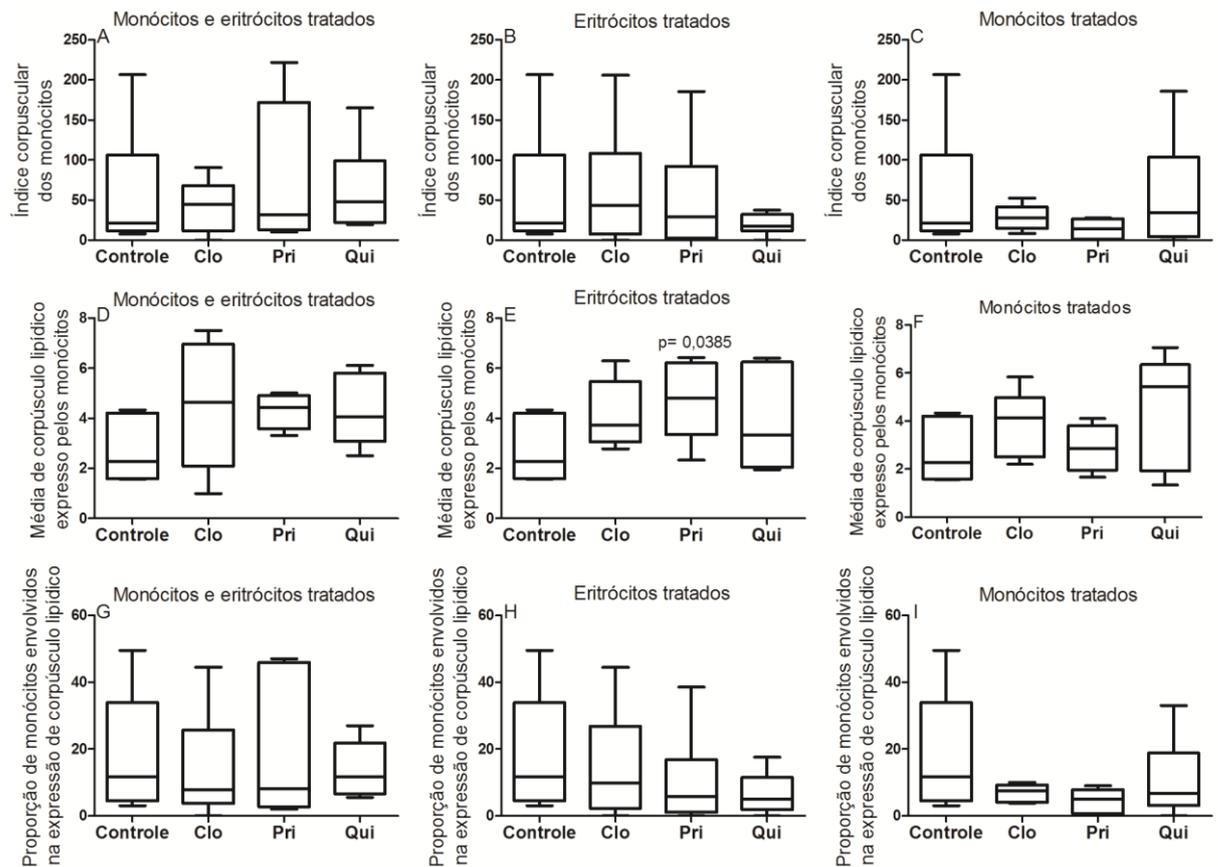


Figura 26. Influência da cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre o índice corpuscular (IC), número médio de corpúsculos lipídicos expressos por monócito e proporção de monócitos expressando corpúsculo lipídico de monócitos humanos estimulados por eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* sensibilizados. (A,B,C) Índice Corpuscular, (D,E,F) Número médio de corpúsculos lipídicos expressos por monócito, (G,H,I) Porcentagem de monócitos expressando corpúsculos lipídicos.

4.8.2. Influencia do tratamento *in vitro* com a cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre a expressão de corpúsculos lipídicos pelos monócitos estimulados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos com eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum*

Quando a expressão dos corpúsculos lipídicos foi avaliada com os monócitos sendo estimulados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos observamos que o tratamento com a cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina por 1 h diminuiu significativamente a mediana do índice corpuscular de 170,1 para 30 ($p= 0,0004$, teste t pareado) com a cloroquina, para 29 ($p= 0,0008$, teste t pareado) com a primaquina e para 23,5 ($p=0,0013$, teste t) com o sulfato de quinina. A mediana da proporção de monócitos que expressando corpúsculos lipídicos também sofreu diminuição significativa com o tratamento por todas as drogas ($p<0,0001$, teste Kruskal Wallis). Não houve alteração na número de corpúsculos expressos por monócito para nenhuma das drogas (FIGURA 27A,D,E)

O mesmo ocorreu quando apenas os eritrócitos foram tratados e quando apenas os monócitos foram tratados com as drogas ($p<0,05$). FIGURA 27B,C,E,F,H,I).

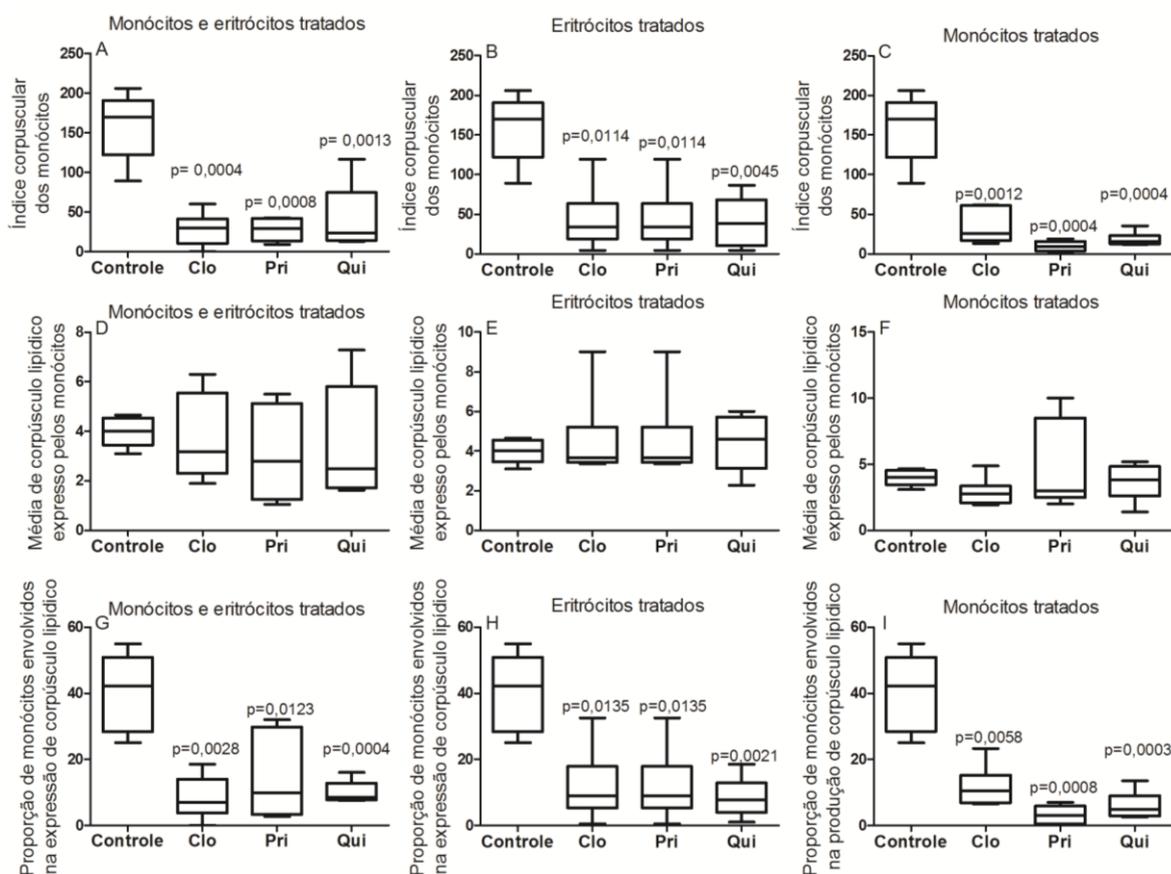


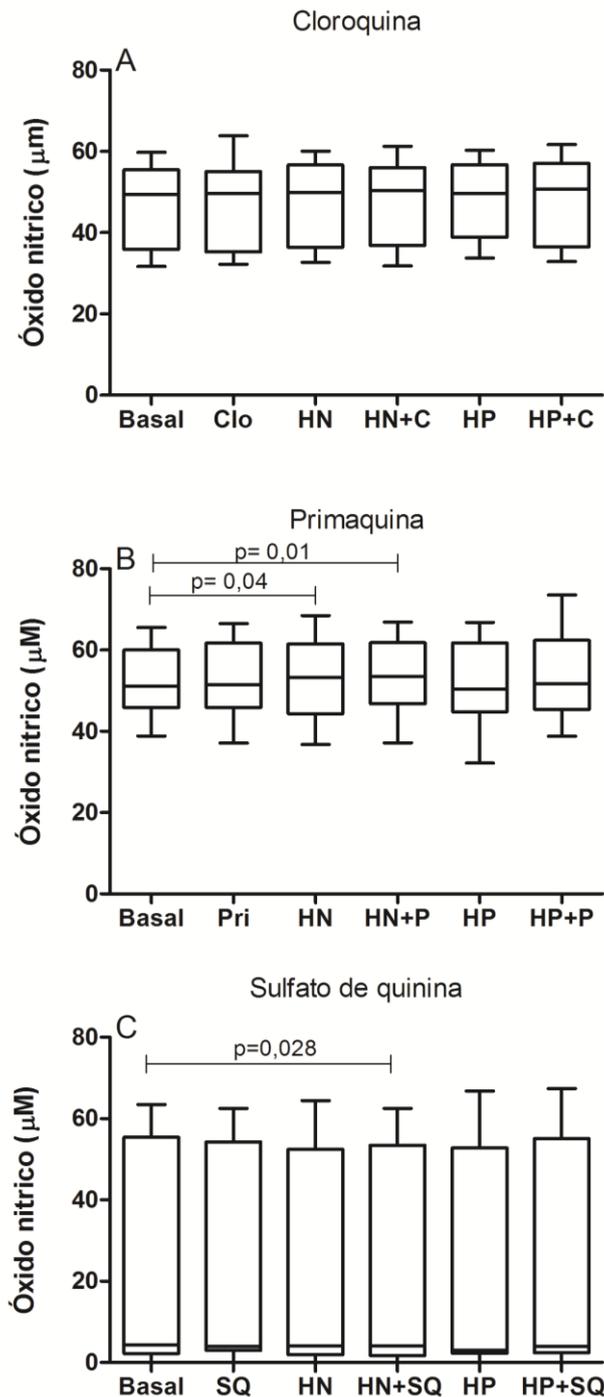
Figura 27. Influência da cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre o índice corpuscular (IC), número médio de corpúsculos lipídicos expressos por monócito e proporção de monócitos expressando corpúsculo lipídico de monócitos humanos estimulados por eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* não sensibilizados. (A,B,C) Índice Corpúsculo, (D,E,F) Número médio de corpúsculos lipídicos expressos por monócito, (G,H,I) Porcentagem de monócitos expressando corpúsculos lipídicos.

4.9. Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico foi determinado para avaliar a influência das drogas antimaláricas estudadas sobre a capacidade de produção de moléculas microbicidas pelos monócitos humanos contra o *P. falciparum*.

4.9.1 Influência da cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pelos eritrócitos infectados ou não pelo *P. falciparum* pelos monócitos humanos

A incubação por 24 h de eritrócitos não parasitados com os monócitos ocasionou um aumento na produção do óxido nítrico (51,18 para 53,32, $p=0,04$, teste t pareado). Quando a primaquina foi acrescentada à cultura, permaneceu o mesmo aumento na produção do NO (51,18 para 53,73, $p=0,011$, teste t pareado). Quando analisamos o influência do sulfato de quinina sobre a produção do NO, houve uma diminuição na produção do NO quando incubamos os monócitos com os eritrócitos normais na presença do sulfato de quinina (4,3 para 4,04, $p=0,028$, Wilcoxon). A cloroquina não influenciou a produção do NO em nosso sistema (FIGURA 28).



CLO- Cloroquina; PRI- Primaquina; SQ- Sulfato de quinina; HN- Hemácia normal; HN+C- Hemácia normal +Cloroquina; HN+P- Hemácia normal +Primaquina; HN+SQ- Hemácia normal +Sulfato de quinina; HP- Hemácia parasitada; HP+C- Hemácia parasitada +cloroquina; HP+P- Hemácia parasitada + Primaquina; HP+SQ- Hemácia parasitada +Sulfato de quinina.

Figura 28. Influência da cloroquina, primaquina e sulfato de quinina na produção *in vitro* de óxido nítrico basal ou estimulado por eritrócitos parasitados ou não pelo *P. falciparum* pelos monócitos humanos. A) Cloroquina, B) Primaquina e C) Sulfato de quinina.

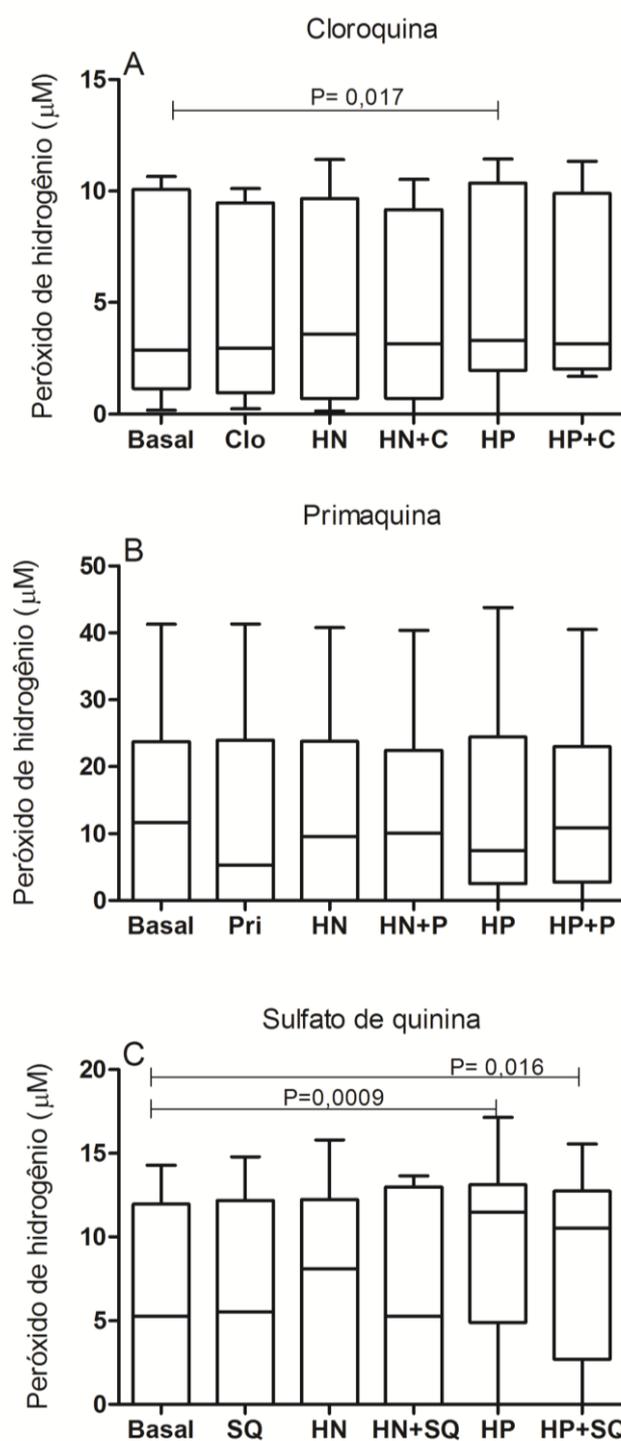
4.10. Produção de Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio foi determinado para avaliar a influência das drogas estudadas sobre a capacidade de produção de moléculas microbidas pelos monócitos humanos de indivíduos saudáveis.

4.10.1. Influência da cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sobre a produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos humanos estimulados por eritrócitos infectados ou não com *P. falciparum*

A incubação dos monócitos com os eritrócitos parasitados aumentou a produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos (5,2 para 11,4, $p=0,009$, Wilcoxon), entretanto com o acréscimo do sulfato de quinino nas culturas não modificou a produção do NO (11,8 para 10,1, $p=0,09$, Wilcoxon). FIGURA 29.

Os outros tratamentos não influenciaram a produção do peróxido de hidrogênio.



CLO- Cloroquina; PRI- Primaquina; SQ- Sulfato de quinina; HN- Hemácia normal; HN+C- Hemácia normal +Cloroquina; HN+P- Hemácia normal +Primaquina; HN+SQ- Hemácia normal +Sulfato de quinina; HP- Hemácia parasitada; HP+C- Hemácia parasitada +cloroquina; HP+P- Hemácia parasitada + Primaquina; HP+SQ- Hemácia parasitada +Sulfato de quinina.

Figura 29. Influência da cloroquina, primaquina e sulfato de quinina na produção *in vitro* de H_2O_2 basal e estimulado ou não com o *P. falciparum* pelos monócitos humanos. A) Cloroquina, B) Primaquina e C) Sulfato de quinina.

Tabela 2. Resumo dos resultados.

	Fármaco			Cloroquina			Primaquina			Sulfato de quinina		
	Células tratadas			M+E	E	M	M+E	E	M	M+E	E	M
Fagocitose geral (rPMP)	IF	=	=	=	↓	=	=	↓	=	↓	=	↓
	Média	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	↑
	%	=	=	=	↓	=	=	↓	=	=	=	↓
Fagocitose geral (rOpsoninas)	IF	↓	↓	↓	↓	=	=	=	=	=	=	=
	Média	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	%	↓	↓	↓	↓	=	=	=	=	=	=	=
Fagocitose de hemozoína (rPMP)	IF	=	=	=	↓	=	=	=	=	=	=	=
	Média	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↑
	%	=	=	=	↓	=	=	=	=	=	=	=
Fagocitose hemozoína (rOpsoninas)	IF	↓	↓	=	↓	=	=	↓	=	=	=	↓
	Média	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	%	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↓
Fagocitose de esquizonte (rPMP)	IF	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	Média	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	%	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Fagocitose de esquizonte (rOpsonina)	IF	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	Média	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	%	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Fagocitose do plasmódio na forma de anel (rPMP)	IF	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	Média	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	%	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Fagocitose do plasmódio na forma de anel (rOpsonina)	IF	=	=	=	=	=	↓	=	=	=	=	=
	Média	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	%	=	=	=	=	=	↓	=	=	=	=	=
Expressão de corpos lipídicos(rPMP)	IC	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Média	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	%	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Expressão de corpos lipídicos (rOpsoninas)	IC	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	Média	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	=	=
	%	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	ENI	EI	CLO	CLO+ENI	CLO+EI	PRI	PRI+ENI	PRI+EI	SQ	SQ+ENI	SQ + EI	
NO	↑	=	=	=	=	=	↑	=	=	↓	=	
H ₂ O ₂	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↑

DISCUSSÃO

Nosso trabalho mostrou pela primeira vez que o sulfato de quinina, a cloroquina e a primaquina deprimiram a expressão de corpúsculos lipídicos nos monócitos humanos e ampliamos o conhecimento sobre a influência dessas três drogas sobre a capacidade fagocitária dos monócitos. Mostramos que o sulfato de quinina deprimiu a capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, principalmente por diminuir a fagocitose de hemozoína. A cloroquina deprimiu a fagocitose principalmente pelos receptores para opsoninas, as custas da menor fagocitose de esquizontes e hemozoína. E a primaquina deprimiu a fagocitose tanto pelos receptores para opsoninas quanto pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.

Neste trabalho foi avaliada a influência *in vitro* das drogas antiplasmodiais cloroquina, primaquina ou sulfato de quinina sobre a capacidade fagocitária, discriminando em nossa análise quando os monócitos e/ou eritrócitos foram tratados com as drogas, procurando melhor esclarecer se as alterações seriam decorrentes da influência imunomoduladora das drogas sobre o monócito ou se era decorrente da maior facilidade para fagocitose pela lesão do plasmódio ocasionada pelo tratamento com as drogas antiparasitárias. Mostramos que as alterações decorrentes do tratamento com o sulfato de quinina foram aparentes apenas quando os monócitos foram tratados, sugerindo que o papel imunomodulador sobre os monócitos foi o predominante. Entretanto, a cloroquina diminuiu a fagocitose tendo efeito depressor sobre os monócitos, mas a fagocitose também mostrou-se deprimida quando apenas os eritrócitos parasitados foram tratados, sugerindo que sua ação antiparasitária influenciou também o resultado da fagocitose.

Nossos resultados estão de acordo com observações prévias que mostraram que a cloroquina diminuiu a fagocitose de eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* pela linhagem de monócitos tumorais J111 de leucemia monocítica (Shalmiev e cols., 1996), diminuiu a fagocitose de partículas de latex, de eritrócitos de carneiro sensibilizados com hemolisina e *Staphylococcus aureus* por monócitos de macacos *Rhesus* infectados com

P. knowlesi, particularmente após a terceira dose do tratamento com cloroquina (Prasad, 1986). Essa última ação dependeu do tempo e da dose da droga agindo sobre os fagócitos (Prasad, 1987). A cloroquina diminuiu também a fagocitose de eritrócitos de carneiro sensibilizados com IgG e de *S. cerevisiae* por monócitos de indivíduos tratados com cloroquina (Osorio e cols, 1992). Entretanto, diferentemente, a cloroquina aumentou a atividade de fagócitos mononucleares humanos para *C. neoformans*, por mecanismo independente de ferro, mas dependente do aumento do pH no fagolisossomo do fagócito (Levitz e cols, 1997). Os mecanismos que têm sido sugeridos para a ação da cloroquina são o aumento do pH lisosomal, a limitação da disponibilidade de ferro intracelular (Levitz, 1997), a ampliação da fusão do fagolisossoma e por romper o tráfico intracelular pela ruptura lisosomal (Meenakshi, 2000). Como nossos dados mostraram que a cloroquina diminuiu a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, é possível que o fármaco tenha diminuído também a capacidade quimiotática dos monócitos.

A menor capacidade fagocitária determinada pela cloroquina ocorreu tanto quando foi feito o tratamento apenas dos monócitos como também apenas dos eritrócitos, sugerindo que a cloroquina pode modificar a função do monócito, mas atua também alterando as características do parasito, dificultando sua fagocitose, possivelmente alterando a susceptibilidade à ligação aos componentes do sistema do complemento. De fato, tem sido mostrado que no desenvolvimento intraeritrocitário do plasmódio ocorre modificações na membrana do eritrócito, com aglomeração do antígeno banda 3 da superfície do eritrócito. Essa alteração propicia a ligação de autoanticorpos à essa região, com deposição da fração C3 do complemento no local, o que facilita a fagocitose do eritrócito parasitado por essa via (Shalmiev e cols., 1996). O tratamento de monócitos com cloroquina reduziu a ligação de IgG às células infectadas (Shalmiev e cols., 1996), sendo provável que isso diminuiu a ligação de C3 à membrana dos eritrócitos justificando a menor capacidade fagocitária pelos receptores para opsoninas que observamos quando os eritrócitos foram tratados com cloroquina.

Quando analisamos a fagocitose pelos receptores para opsoninas, o processo de ingestão dos eritrócitos parasitados ocorre principalmente pelos receptores para complemento. As proteínas do sistema do complemento fazem parte da imunidade inata, são quimiotáticas e facilitam a fagocitose pelos monócitos. Porém, quando esse sistema é ativado em excesso, pode atuar mediando a patogênese da infecção malárica (Silver, 2010). Sustentando essa idéia, Patel et al. (2008), usando um modelo murino, bloqueou o receptor para C5a e mostrou que essa interferência aumentou a sobrevivência dos animais suscetíveis à malária cerebral. Estes dados implicam a excessiva ativação do sistema do complemento na patogênese da malária cerebral experimental. O bloqueio *in vitro* da deposição de complemento impediu entre 80 a 95% da fagocitose dos eritrócitos infectados com o parasito na fase em anel (Turrini e cols., 1992). A teoria de que a ativação excessiva do complemento contribui para a malária grave tem instigado a investigação de mecanismos reguladores que possam controlar a hiperativação do complemento, tais como o bloqueio do CR1, CD35, CD55 e CD59 (Cornacoff e cols., 1983).

Estudos *in vitro* mostraram que a ação anticomplemento da cloroquina ocorreu apenas quando a droga foi utilizada em dose muito acima da terapêutica, sendo o consumo do complemento observado mesmo na ausência de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . A cloroquina também promoveu hemólise de eritrócitos de coelho mesmo na presença de Mg^{2+} e do ácido tetraacético etileno glicol (EGTA), que é um quelante principalmente do cálcio. Estudos por imunoelektroforese bidimensional incubando soro humano fresco, cloroquina e anticorpos contra o anti-C3 específico e anti-fator B mostrou que a cloroquina pode clivar o C3 e fator B. Entretanto, a cloroquina não conseguiu exercer efeito inibitório na ativação do complemento por imunocomplexos. Estudos do perfil das moléculas do complemento no soro de pacientes com malária pelo *Plasmodium falciparum* tratados com cloroquina mostrou que os níveis séricos do C3 estavam sempre diminuídos, e reduções marginais nos níveis de C4, factor B e properdina ocorria em alguns destes pacientes. Entretanto, a administração da cloroquina para

indivíduos normais não modificou o perfil do complemento no soro, sugerindo que atuação sobre o sistema do complemento foi devida ao plasmódio e não á droga (Chakrabarty,1985).

Em seu trabalho,Turrini (1992) mostrou que os eritrócitos infectados opsonizados com soro não imune são mais fagocitados pelos macrófagos derivados dos monócitos humanos, o que pode fornecer a primeira linha de defesa contra a infecção malárica em indivíduos não imunes.

O sulfato de quinina e a primaquina deprimiram a capacidade fagocitária total quando foi analisada pelos receptores para padrões moleculares de patógeno, quando monócitos e eritrócitos foram tratados concomitantemente com essas drogas. Para a primaquina, predominou a depressão da fagocitose das formas em hemozoína. Interessantemente, o tratamento com o sulfato de quinina deprimiu a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, entretanto, aumentou o número de eritrócitos parasitados ingeridos por monócito, tanto quando monócitos e eritrócitos parasitados foram tratados com a quinina, como também quando apenas os monócitos foram tratados com a droga, sugerindo que a ação da droga foi mais importante sobre os fagócitos, desde que não alterou a fagocitose quando apenas os eritrócitos foram tratados com o sulfato de quinina.

Trabalhos anteriores buscaram caracterizar os componentes responsáveis pelo reconhecimento de eritrócitos infectados pelos macrófagos, nos vários estágios de desenvolvimento do parasita e mostraram que a fagocitose aumentava notavelmente com a maturação do parasito, o que explicaria o fato de ser a forma em anel a forma do parasito que foi menos fagocitada em nosso estudo. Observou-se que o aumento da fagocitose foi paralelo ao aumento da atividade metabólica do parasito e às alterações estruturais e funcionais resultantes na membrana do eritrócito do hospedeiro. Essas alterações junto com a maior ligação de IgG e componentes do complemento à superfície dos eritrócitos infectados poderiam explicar a preferência da fagocitose pelas formas mais adiantadas de desenvolvimento do parasito (Turrine,1992). Na fagocitose mediada pelo

complemento, a ingestão do eritrócito infectado pelas formas em anel foi maior do que das formas em trofozoíto ou esquizonte (Shalmiev, 1996)

Vários dos receptores estão envolvidos na adesão do *P. falciparum* às células endoteliais, aos eritrócitos e plaquetas e também estão presentes em subpopulações de leucócitos, incluindo CD36, ICAM1, NCAM (CD56), gC1qR, o receptor de complemento 1 (CR1) (Rowe, 2009).

Na fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógeno, a molécula CD36 presente na superfície do eritrócito parasitado é a principal molécula de ligação ao fagócito, como também ao endotélio vascular (Barnwell, 1989). O CD36 é uma glicoproteína de membrana que está presente nas plaquetas, monócitos/macrófagos, adipócitos, hepatócitos e miócitos (Rowe, 2009). A ligação do CD36 ao seu receptor é uma propriedade de quase todos os isolados de *P. falciparum* derivados de pacientes com malária (Rowe, 2009). Quando o macrófago se liga aos eritrócitos infectados pelo CD36, a fagocitose não induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que a ligação de CD36 pode levar a evasão do parasito (Mcgilvray, 2000; Rowe, 2009), entretanto pode favorecer o hospedeiro por diminuir a hiperativação do sistema imunitário.

O CR1 é um receptor para componentes do sistema do complemento que está presente em eritrócitos, leucócitos e células dendríticas foliculares. Há evidências de que ele seja o receptor que determina a formação de rosetas, pois tem sido mostrado que os eritrócitos que não possuem esse receptor apresentam menor formação de rosetas, o que pode resultar em uma proteção contra a malária grave (Rowe, 2000; Rowe, 2009). É possível que a depressão da fagocitose pelo sulfato de quinina ocorra pela diminuição da expressão de receptores para padrões moleculares de patógeno, resultando em uma menor ingestão do parasito pela menor ligação à molécula CD36. Uma possibilidade promissora para a diminuição da morbimortalidade na malária seria o melhor esclarecimento do papel do sulfato de quinino em diminuir a expressão da molécula CD36 e de seus receptores, pois a droga poderia modular negativamente moléculas que participam da fisiopatogenia das formas graves da malária.

Deve ser reforçado que o tratamento com o sulfato de quinina diminuiu a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, entretanto, aumentou o número de eritrócitos parasitados ingeridos por monócito, tanto quando os monócitos e os eritrócitos parasitados foram tratados com a quinina, quanto quando apenas os monócitos foram tratados com a droga, sugerindo que a ação da droga foi mais importante sobre a célula e não sobre o eritrócito infectado.

Dentre as drogas estudadas, a primaquina e o sulfato de quinina diminuíram a fagocitose pelos rPMP. Não está ainda esclarecido os mecanismos pelos quais essas drogas diminuem a fagocitose, entretanto, algumas possibilidades podem ser sugeridas. Sua ação inibindo a expressão de receptores para o CD36 seria uma possibilidade, pelo importante papel que desempenha essa molécula nos processos de aderência do eritrócito parasitado (Barnwell, 1989). O fato da glicoproteína CD36 estar expressa também na membrana dos monócitos/macrófagos, além das plaquetas, adipócitos, hepatócitos, miócitos (Rowe, 2009), pode justificar a fagocitose ter diminuído quando apenas os monócitos receberam o tratamento com a primaquina e o sulfato de quinina, mas não quando apenas os eritrócitos foram tratados, sugerindo uma modulação da expressão dessa molécula nos monócitos quando eles foram exclusivamente tratados com as drogas. Em adição, Gowda (2013) mostrou que a ligação ao CD36 contribui para a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células dendríticas e Huh e cols. (1996) demonstraram um aumento transitório da expressão de CD36 durante a diferenciação *in vitro* de monócitos do sangue periférico em macrófagos em cultura, e sugeriu a regulação na transcrição de CD36 como o principal ponto de controle da expressão dessa molécula. Estudos em camundongos indicam que o CD36 também contribui para a captura de eritrócitos infectados pelo *P. falciparum* pelas células dendríticas (Gowda, 2013).

Nossos dados mostaram pela primeira vez o papel imunomodulador da cloroquina, primaquina e sulfato de quinina diminuindo a expressão de corpúsculo lipídico (CL) em monócitos humanos estimulados com eritrócitos

infectados pelo *P. falciparum* pelos receptores para padrões moleculares de patógeno. Entretanto, essas drogas não influenciaram a expressão dos corpúsculos lipídicos quando os monócitos foram estimulados pelos receptores para opsoninas. Nossos dados mostraram concordância da ação da primaquina e do sulfato de quinina quando estimuladas pelos receptores para padrões moleculares de patógeno, pois ambas deprimiram as funções dos fagócitos, tanto a fagocitose quanto a expressão dos corpúsculos lipídicos.

Os CL participam do armazenamento e processamento de lipídios e estão presentes em todos os organismos. Estão distribuídos perto dos fagolisossomos, e estão envolvidos em diversos processos celulares como a sinalização, tráfico de membranas e síntese de mediadores inflamatórios (Bozza e cols., 2011). A formação dessa organela, sua constituição lipídica e o seu comprometimento com a produção de mediadores lipídicos específicos estão diretamente relacionados ao estímulo inflamatório envolvido.

O fato de que a diminuição da expressão dos corpúsculos lipídicos ocorreu apenas quando os monócitos foram estimulados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, sugere que a via de estimulação do fagócito foi determinante de sua ação na modulação dos corpúsculos lipídicos.

Segundo D'Avila e cols.,(2011) alguns patógenos intracelulares se beneficiam da formação de corpúsculo lipídico nas células hospedeiras e essa organela associada com os vacúolos parasitóforos foram demonstradas em infecções por *Trypanosoma cruzi*. O que também foi visto em infecções pelo *Toxoplasma gondii* (Charron, 2002) e *P. falciparum* (Jackson e cols., 2004, Borges, 2013).

Ao analisar o início da infecção *in vitro* pelo *T. cruzi*, Melo e cols (2003) mostraram que o aumento da produção de CL pelos macrófagos peritoniais de camundongos pode ser induzida por patógenos, como também o aumento da síntese de PGE₂, o que sugere que essas organelas têm a função de aumentar a produção de eicosanóides durante a infecção.

Nossos dados mostraram que as drogas antimaláricas estudadas causaram uma queda importante na expressão dos corpúsculos lipídicos quando o estímulo dos fagócitos ocorreu pela fagocitose pelos rPMPs, o que sugere que a modulação da expressão dos corpúsculos lipídicos pode ser dependente também dos receptores CD36.

Nos compartimentos dos corpúsculos lipídicos ocorre o metabolismo do ácido araquidônico, que é o mais importante substrato utilizado na síntese de eicosanoides pelas enzimas COX e LOX. Possuem também uma grande quantidade de proteínas relacionadas com o processo de sinalização celular e endereçamento de vesículas (Wan e cols., 2007; Bozza e cols., 2011). É provável que com a diminuição da expressão dos receptores para o CD36, o estímulo para a produção das proteínas ciclooxigenase 2 (CoX) e 5-lipoxigenase (5-LOX) também sofrem depressão, prejudicando a formação de prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente, que são produzidas e armazenados principalmente nos corpúsculos lipídicos (Borges, 2013). Como a expressão dos corpúsculos está aumentada na malária (Borges, 2013), sua diminuição pelas drogas antiparasitárias pode ser uma ação moduladora dos mecanismos determinantes da imunopatogenia nas formas graves da malária.

As propriedades destas enzimas sugerem que elas possam fazer parte dos mecanismos de proteção que estão envolvidos durante a infecção pelo plasmódio, e poderiam neutralizar os efeitos potencialmente deletérios da combinação de heme circulante, citocinas e leucócitos ativados (Hunt, 2006). As prostaglandinas são potentes mediadores de respostas inflamatórias, incluindo a vasodilatação, febre e dor. A 15-lipoxigenase induz a apoptose de células endoteliais, mostrando que as lipoxigenases podem ter um papel na patogênese da malária cerebral (Hunt, 2006).

Xião e cols. (1999) mostraram que camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com aspirina apresentaram uma sobrevivência maior e que a prostaglandina se mostrou protetora em relação ao desenvolvimento de malária cerebral, enquanto, os leucotrienos foram relacionados à gravidade da doença.

Para Borges (2013), a menor expressão de COX-2 e 5-LOX nos camundongos BALB/c que não desenvolvem a malária cerebral sugere a importância da exacerbação dessas duas vias no desenvolvimento da doença cerebral, e que possivelmente a superprodução dos eicosanóides possa desempenhar um papel importante no desenvolvimento da malária cerebral.

Nos leucócitos, a formação de corpúsculos lipídicos teria um importante papel durante a resposta inflamatória em diversos processos patogênicos (D'Avila, 2008). Na infecção por patógenos, tem sido mostrado que estas organelas participam ativamente da produção de mediadores durante a infecção. D'Avila e cols.(2008) mostrou que componentes isolados da membrana de *M. bovis* aumentaram a expressão de corpúsculos lipídicos em macrófagos.

O efeito depressor da fagocitose pelos rPMP e na expressão dos corpúsculos lipídicos determinado pelas drogas antimaláricas cloroquina, primaquina e sulfato de quinina sugere que essa modulação negativa pode ter um papel protetor para o desenvolvimento das formas graves da doença.

Para ocorrer a morte microbiana, os monócitos produzem ânion superóxido, que são convertidos por essas células em peróxido de hidrogênio, outra molécula microbicida. Nossos resultados mostraram que os eritrócitos parasitados, quando não sofreram efeito das drogas estudadas, promoveram um aumento na produção do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo que não houve aumento quando a cultura foi feita com eritrócitos não parasitados, sugerindo que as espécies reativas de oxigênio são produzidos em resposta ao parasito. Tem sido observado que a produção de H₂O₂ e OH⁻ em eritrócitos infectados com trofozoíto foi consideravelmente reduzida quando o processo de digestão no fagolisossoma da célula hospedeira foi inibida por anti-proteases, que reduzem a proteólise de catalase, ou pela alcalinização do meio com cloreto de amônia, que reduz a formação de meta-hemoglobina (Atamna, 1993).

Tem sido mostrado que o H₂O₂ em concentrações baixas foi citotóxico para o *Plasmodium yoelii* e o *Plasmodium berghei in vitro*, mostrando a ação

microbicida desse radical (Dockrell 1983). Entretanto, é provável que o aumento da produção do peróxido de hidrogênio por nós observado pelo tratamento com o sulfato de quinino tenha decorrido do estímulo pelo eritrócito parasitado, pois quando a incubação ocorreu isoladamente com a droga não houve aumento da produção desse radical livre. Enquanto o sulfato de quinino aparentemente produziu uma pequena diminuição na produção do óxido nítrico, entretanto, como a variabilidade de nossos resultados foi grande, precisa melhor esclarecimento. Diferentemente de nossos resultados, Shalmiev (1996) mostrou que a cloroquina aumentou na produção de radicais de oxigênio e nitrogênio. A produção exacerbada do NO pode dificultar a sinalização neuronal, causar dano oxidante e danos nas células vermelhas do sangue, que leva a anemia, porém evidências sustentam a idéia de que a produção é limitada durante a infecção pela malária. A baixa disponibilidade do NO durante a doença parece está envolvida com a patogenicidade da infecção e sua restituição pode ser encarada como terapia para a doença (Sobolewski, 2005). Cramer e cols. (2005) mostraram que em crianças com malária grave o óxido nítrico teve relação com a redução da parasitemia, mas esse efeito diminuiu em crianças mais velhas, sugerindo predominância de respostas imunes inespecíficas à infecção na infância.

Uma possível limitação para esse estudo seria o fato de termos tratado os fagócitos com as drogas *in vitro* e não *in vivo*, pois o último representaria mais fidedignamente o que ocorre no organismo durante a doença e o tratamento. Entretanto, para avaliação *in vivo* de indivíduos normais tratados com as drogas há os impedimentos éticos óbvios e para análise dos indivíduos durante a infecção e tratados com as drogas não seria possível excluir a influência da própria infecção sobre os fagócitos, como a produção exacerbada de citocinas que modificam as funções dessas células.

Em conclusão, nossos dados mostraram que a cloroquina, a primaquina e o sulfato de quinino podem ter um efeito imunomodulatório sobre as funções dos monócitos e que essas ações imunomodulatórias devem se somar aos efeitos antiparasitários no tratamento da doença por essas drogas.

CONCLUSÕES

Em relação à fagocitose, podemos concluir que:

a) Para a cloroquina:

A cloroquina diminuiu a capacidade fagocitária total dos monócitos, quando avaliada pelos receptores para opsoninas, quando monócitos e eritrócitos foram tratados com a droga. Esse padrão se repetiu para a fagocitose de esquizontes quando somente os eritrócitos foram tratados, como também quando a fagocitose de hemozoína foi quantificada individualmente, quando tanto monócitos quanto eritrócitos foram tratados com a droga.

A cloroquina diminuiu a fagocitose de esquizontes pelos receptores para padrões moleculares de patógenos quando os eritrócitos infectados foram tratados com a droga.

b) Para a primaquina:

A primaquina diminuiu o índice fagocitário e a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose total, pelos receptores para opsoninas, quando monócitos e eritrócitos foram tratados. Observou-se também diminuição da fagocitose das formas em anel quando monócitos foram tratados e diminuição do índice fagocitário para hemozoína quando monócitos e eritrócitos foram tratados.

Quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, houve diminuição do índice fagocitário e da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose pelo tratamento com a primaquina dos monócitos e eritrócitos. Houve diminuição da fagocitose das formas em hemozoína pelo tratamento dos monócitos e eritrócitos parasitados com a primaquina.

c) Para o sulfato de quinina:

O sulfato de quinina diminuiu a fagocitose de hemozoína pelos receptores para opsoninas quando monócitos e eritrócitos foram tratados.

O sulfato de quinina diminuiu o índice fagocitário total, o percentual de monócitos envolvidos na fagocitose e a média de eritrócitos parasitados

fagocitados por monócito pelos receptores para PAMPs quando os monócitos e eritrócitos foram tratados e quando somente monócitos foram tratados. A fagocitose de hemozoína diminuiu após o tratamento dos monócitos.

Expressão de corpos lipídicos pelos monócitos

Quando os monócitos foram estimulados com eritrócitos parasitados, o tratamento com a cloroquina, primaquina e sulfato de quinina diminuiu a expressão dos corpúsculos lipídicos. Isso não foi observado quando os monócitos foram estimulados com os eritrócitos parasitados sensibilizados.

Produção de radicais de oxigênio e nitrogênio.

A primaquina aumentou a produção de óxido nítrico quando os monócitos foram estimulados com eritrócitos não parasitados. O sulfato de quinina diminuiu a produção de óxido nítrico quando os monócitos foram estimulados pelos eritrócitos normais. Enquanto que aumentou a produção do peróxido de hidrogênio quando os monócitos foram estimulados pelos eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum*.

Tabela 3. Resumo das conclusões.

	Fármaco						Cloroquina	Primaquina	Sulfato de quinina		
	Células tratadas									Monócito e Eritrócito tratados	
Fagocitose geral (rPMP)	IF						=	↓	↓		
	Média						=	=	↑		
	%						=	↓	↓		
Fagocitose de hemozoína (rPMP)	IF						=	↓	=		
	Média						=	=	=		
	%						=	↓	=		
Fagocitose de esquizonte (rPMP)	IF						=	=	=		
	Média						=	=	=		
	%						=	=	=		
Fagocitose do plasmódio na forma de anel (rPMP)	IF						=	=	=		
	Média						=	=	=		
	%						=	=	=		
Fagocitose geral (Opsoninas)	IF						↓	↓	=		
	Média						=	=	=		
	%						↓	↓	=		
Fagocitose hemozoína (Opsoninas)	IF						↓	↓	↓		
	Média						=	=	=		
	%						=	=	=		
Fagocitose de esquizonte (Opsonina)	IF						=	=	=		
	Média						=	=	=		
	%						=	=	=		
Fagocitose do plasmódio na forma de anel (Opsonina)	IF						=	=	=		
	Média						=	=	=		
	%						=	=	=		
Expressão de corpos lipídicos (rPMP)	IC						↓	↓	↓		
	Média						=	=	=		
	%						↓	↓	↓		
Expressão de corpos lipídicos (Opsoninas)	IC						=	=	=		
	Média						=	=	=		
	%						=	=	=		
	ENI	EI	CLO	CLO+ ENI	CLO+ EI	PRI	PRI+ ENI	PRI+EI	QUI	QUI+ ENI	QUI + EI
NO	↑	=	=	=	=	=	↑	=	=	↑	=
H ₂ O ₂	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	↑

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antinori S, e cols. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012; 4: e 2012013.

Antonelli LR, e cols. The CD14.CD16.inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Pathog*. 2014; 10: e 1004393.

Atamna H, Ginsburg H. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 61: 231-242.

Barnwell JW, e cols. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Clin Invest*. 1989; 84: 765- 772.

Borges TKS. Mecanismos de resposta inflamatória em modelos murinos de *Plasmodium berghei* ANKA, suscetíveis ou não à malária cerebral. Tese de doutorado. Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília; 2013.

Bozza PT, e cols. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. Prostaglandins leukotrienes and essential fatty acids. 2011; 85: 205– 213.

Bray PG, e cols. Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol Microbiol*. 2005, 56:323-33.

Chakrabarty AK, e cols. Effects of Chloroquine on the Serum Complement System. *Immunopharmacology*. 1985; 10: 111- 118.

Charron AJ, e cols. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*.2002; 115: 3049- 59.

Chassaing JA. Malaria y fármacos antimaláricos. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2001; 21: 85- 88.

Cornacoff JB, e cols. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J Clin Invest*. 1983; 71: 236– 247.

Cramer JP, e cols. Age-dependent effect of plasma nitric oxide on parasite density in Ghanaian children with severe malaria. *Trop Med Int Health*. 2005; 10: 672– 680.

D'Avila H, e cols. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with

prostaglandin E₂ generation and increased parasite growth. *J Infect Dis.* 2011; 204: 951-61.

D'Avila H, e cols. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8: 1308–1315.

D'Avila H, e cols. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin production by macrophages. *Cell Microbiol.* 2008;10: 2589–2604.

Davis JM, e cols. My treatment approach to rheumatoid arthritis. *Mayo Clin Proc.* 2012; 87: 656- 73.

de Ridder S, e cols. *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. *J Ethnopharmacol.* 2008; 120: 302– 314.

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

Dyer M, e cols. Expression of *Plasmodium falciparum* trimeric G proteins and their involvement in switching to sexual development. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 108: 67– 78.

Ferreira MES, e cols. Metemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* em uso oral de primaquina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44: 113- 115.

Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sciences.* 2004; 74: 1957– 1972.

Fletcher KA, e cols. Studies on the pharmacokinetics of primaquine. *Bulletin of the World Health Organization.* 1981;59: 407-412.

Foley M, e cols. Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance and prospects for new agents *Pharmacol Ther.* 1998; 79: 55–87.

Franklin BS, e cols. Malaria primes the innate immune response due to interferon- γ induced enhancement of Toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad.* 2009; 106: 5789- 5794.
Fundação Nacional de Saúde. Portaria n.º 355/2000/FUNASA.

Golenser J, e cols. Conventional and experimental treatment of cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2006; 36: 583–593.

Gostner JM, e cols. Antimalarial drug chloroquine counteracts activation of indoleamine (2,3)-dioxygenase activity in human PBMC. *FEBS Open Bio.* 2012; 2: 241- 5.

Gowda NM, e cols. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *J Immunol.* 2012; 188: 5073–5085.

Huh HY, e cols. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage Differentiation: Potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood.* 1996; 87: 2020-2028.

Hunt NH, e cols. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2006; 36: 569–582.

Islahudin F, e cols. The antimalarial drug quinine interferes with serotonin biosynthesis and action. *Sci Rep.* 2014; 4: 3618.

Jackson KE, e cols. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 2004; 54: 109–122.

Jang CH, e cols. Chloroquine inhibit production of TNF- α , IL-1b and IL-6 from lipopolysaccharide stimulated human monocytes/ macrophages by different modes. *Rheumatology (Oxford).* 2006; 45: 703-10.

Koncarevic S, e cols. SELDI-TOF-MS analysis of chloroquine resistant and sensitive *Plasmodium falciparum* strains. *Proteomics.* 2007; 7: 711-721.

Krotoski WA, e cols. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; 31:1291-1293.

Langhorne J, e cols. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol.* 2008; 7: 725- 32.

Laurence LB, e cols. As bases farmacológicas da terapeutica de Goodman & Gilmar. 12^o ed. Porto Alegre: AMGH. 2012

Levitz SM, e cols. Chloroquine induces human mononuclear phagocytes to inhibit and kill cryptococcus neoformans by a mechanism independent of iron deprivation. *J Clin Invest.* 1997; 100:1640–1646.

Liehl P, e cols. Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. *Nature Med.* 2014; 20: 47– 53.

Marques AC, e cols. Manual de terapêutica da malária. Ministério da Saúde-Brasília. Fundação Nacional de Saúde. 2001

Martin RE, e cols. Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science.* 2009; 325:1680- 2.

McGilvray ID, e cols. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood*. 2000; 96: 3231-3240.

Meenakshi B, e cols. Effect of chloroquine on phagolysosomal fusion in cultured guinea pig alveolar macrophages: implications in drug delivery. *AAPS PharmSci*. 2000; 2:E34.

Melo RCN, e cols. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue & Cell*. 2003; 35: 59–67.

Miller JL, e cols. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell Rep*. 2014; 7: 436– 447.

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

Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Situação epidemiológica-dados: Resumo epidemiológico. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

Ministério da Saúde. Manual de terapia da malária. Brasília. Fundação nacional de saúde, 2001.

Ministério da Saúde. Saúde Pública. Doenças negligenciadas: Estratégias do Ministério da saúde, 2010. São Paulo, v.44, n. 1.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2a ed. Brasília. 2009.

Mueller I , Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, del Portillo HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 2009; 9: 555- 66.

Muniz-Junqueira MI, Tosta CE. The pathological bases of immunomodulatory therapy in malaria. *Antibiotiques*. 2007 ; 9 : 164- 72.

Ockenhouse CF, e cols. Common and divergent immune response signaling pathways discovered in peripheral blood mononuclear cell gene expression

patterns in presymptomatic and clinically apparent malaria. *Infect Immun.* 2006; 74: 5561– 5573.

Olliaro PL, Goldberg DE. The *Plasmodium* digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. *Parasitol Today.* 1995; 11: 294- 297.

Osorio LM, e cols. Inhibition of human monocyte function by prophylactic doses of chloroquine. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 46:165- 8.

Patel SN, e cols. C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. *J Exp Med.* 2008; 205: 1133– 1143.

Prasad RN, e cols. Immunopharmacology of chloroquine. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81:168- 9.

Prasad RN, e cols. Phagocytic function of monocytes of rhesus monkeys during *Plasmodium knowlesi* infection and the effect of treatment with chloroquine. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1986; 80: 886- 888.

Radfar A, e cols. Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 2034- 42.

Robert I. Fox mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin Arthritis Rheum.* 1993; 23: 82- 91.

Rosenthal PJ. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol.* 2003; 206: 3735- 3744.

Rowe J A, e cols. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med.* 2009; 11: e16.

Rowe JA, e cols. Mapping of the region of complement receptor (CR) 1 required for *Plasmodium falciparum* rosetting and demonstration of the importance of CR1 in rosetting in field isolates. *J Immunol.* 2000; 165: 6341- 6346.

Salako LA. Pharmacokinetics of antimalarial drugs: Their therapeutic and toxicological implications. *Ann Ist Super Sanità.* 1985; 21:315-326.

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

Sexton AC, e cols. Transcriptional profiling reveals suppressed erythropoiesis, up-regulated glycolysis, and interferon-associated responses in murine malaria. *J Infect Dis.* 2004; 189: 1245–1256.

Shalmiev G, e cols. Antimalarial drugs inhibit the phagocytosis of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*1996; 90: 558- 62.

Sharma S e cols. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity.* 2011; 35: 194– 207.

Silva JC, e cols. Hydroxychloroquine decreases Th17-related cytokines in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Clinics.* 2013; 68: 766-71.

Silver KL, e cols. Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cell Microbiol.* 2010;12: 1036– 1045.

Slater AFG. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmac. Ther.* 1993; 57: 203- 235.

Sobolewski P, e cols. Nitric oxide bioavailability in malaria. *Trends Parasitol.* 2005; 21: 415–422.

Sponaas AM e cols. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood.* 2009; 114: 5522– 5531.

Stephen MW, Stuart ML. chloroquine interferes with lipopolysaccharide - induced TNF- α gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J Immunol.* 2000; 165: 1534- 1540.

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

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

Sweeney AW. Wartime research on malaria chemotherapy. *Parassitologia.* 2004; 2: 33-45.

Turrini F, e cols. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. *Blood.*1992; 80: 801- 808.

Wan HC. e cols. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J.* 2007; 21: 167-78.

Wanwimolruk S, e cols. Lack of effect of oral contraceptive use on the pharmacokinetics of quinine. *Br J clin Pharmac.*1991; 31:179-181.

Wells TN, e cols. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. Trends Parasitol. 2010; 26: 145-15.

WHO. World Health Organization. 2006.

WHO. World Health Organization. Expert Committee on Malaria: Twentieth Report, Technical Report Series. 2000.

WHO. World Health Organization. World Malaria Report 2009.

WHO. World Health Organization. World Malaria Report 2014.

Wirth CC, Pradel G. Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. Int J Med Microbiol. 2012; 302: 172-178.

Xiao L, e cols. Role of eicosanoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60: 668-673.

ANEXOS

Anexo I



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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: OSCAR MARTIN MESONES LAPOUBLE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17190913.2.0000.0030

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

Patrocinador Principal: FUNDACAO UNIVERSIDADE DE BRASILIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 365.997

Data da Relatoria: 31/07/2013

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

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



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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatório foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

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



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



Continuação do Parecer: 365.997

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BRASILIA, 20 de Agosto de 2013

Assinador por:
Natan Monsores de Sá
(Coordenador)

Anexo II



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CELULAR

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

O (a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto “Influência das drogas antiplasmodiais nas funções do sistema imunitário envolvidas na defesa contra as formas eritrocitárias e gametócitos”.

Esclarecemos que este projeto vai verificar se o tratamento contra a malária altera o funcionamento das células do sangue para fazer a defesa contra a doença. Tal estudo trará benefícios para os pacientes, uma vez que o esclarecimento de fatores envolvidos na doença permite uma melhor avaliação, seguimento e possibilidade terapêutica para os pacientes.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a). A sua participação será através de uma amostra de sangue, serão retirados 20 mL de sangue de uma veia do seu braço e o material utilizado para retirada do seu sangue será estéril.

Você poderá sentir algum desconforto na hora da coleta do sangue. Poderá ocorrer uma pequena vermelhidão no local onde for coletado o sangue, e depois ficar roxo no local, como também poderá ter um pouco de tontura. Os pesquisadores darão todo o suporte que o senhor necessitar se ocorrer qualquer alteração devida à coleta do sangue.

Informamos que o(a) senhor(a) pode se recusar a participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Instituição Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição.

Se o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Oscar M. Mesones Lapouble, no (61) 8134-6478 entre 08:00 e 18:00.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail ceps@unb.br.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Nome / assinatura

Shirley Claudino Couto
Mariangela Souza de Oliveira
Nome e assinatura

Brasília. de de

Anexo III

Tabela 4. Características antropométricas dos indivíduos cujas amostras sanguíneas foram analisadas para o teste de fagocitose em placa.

Indivíduo	Idade (Anos)	Gênero (Masculino e Feminino)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC
1	45	M	61	1,73	20,38
2	21	M	73	1,8	22,53
3	26	F	76	1,6	29,68
4	23	F	77	1,61	29,7
5	32	M	72	1,7	24,9
6	23	M	64	1,67	22,95
7	32	M	82	1,7	28,37
8	26	M	74	1,66	26,85
9	28	M	79	1,77	25,21
10	45	M	69	1,8	21,29
11	47	M	64	1,66	23,22
12	44	F	65	1,63	24,46
13	30	M	88	1,74	29,06
14	35	M	74	1,75	24,16
15	30	M	82	1,66	29,75
MD± DP Total	32,47± 8,83	12/3	73,33± 7,72	1,69± 0,06	25,5± 3,2

M- Masculino; F- Feminino; MD- Média; IMC- Índice de Massa Corporal;
DP- Desvio Padrão.

Anexo IV

Tabela 5. Características antropométricas dos indivíduos cujas amostras sanguíneas foram analisadas para quantificação de corpúsculo lipídico.

Indivíduo	Idade (Anos)	Gênero (Masculino e Feminino)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC
1	30	F	55	1,57	22,31
2	21	M	73	1,8	22,53
3	20	M	74	1,86	21,39
4	31	M	86	1,73	28,73
5	27	M	73	1,75	23,84
6	30	F	67	1,7	23,18
MD± DP Total	26,5±4,85	4/2	71,33± 10,13	1,73± 0,09	23,6± 2,61

M- Masculino; F- Feminino; MD- Média; IMC- Índice de Massa Corporal;
DP- Desvio Padrão.

Anexo V

Tabela 6. Características antropométricas dos indivíduos cujas amostras sanguíneas foram analisadas para avaliar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Indivíduo	Idade (Anos)	Gênero (Masculino e Feminino)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC
1	26	F	66	1,67	23,66
2	45	M	61	1,73	20,38
3	36	M	85	1,72	28,73
4	31	M	76	1,83	22,69
5	38	M	75	1,63	28,23
6	26	F	76	1,6	29,69
7	22	F	46	1,6	17,97
8	33	M	72	1,75	23,51
9	29	M	72	1,76	23,24
10	48	F	68	1,53	29,05
11	32	M	72	1,7	24,91
12	33	F	67	1,6	26,17
13	27	M	75	1,78	23,67
14	30	M	64	1,67	22,95
15	34	M	69	1,65	25,34
16	37	F	61	1,67	21,87
17	21	M	80	1,85	23,37
18	53	M	77	1,65	28,28
19	47	M	70	1,75	22,85
20	30	M	53	1,59	20,96
21	44	F	65	1,63	24,46
22	45	M	78	1,78	24,62
23	30	F	63	1,46	29,55
24	49	M	87	1,74	28,73
25	36	M	89	1,75	29,06
26	36	M	82	1,77	26,17
27	35	M	74	1,75	24,16
28	25	M	70	1,78	22,09
29	21	M	72	1,81	21,98
30	30	M	82	1,66	29,76
31	47	M	60	1,58	24,03
MD± DP Total	34,7±8,8	23/8	71,19±9,5 7	1,69± 0,09	24,9± 3,12

M- Masculino; F- Feminino; MD- Média; IMC- Índice de Massa Corporal; DP- Desvio Padrão.