

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Ludmila Ponce Monken Custódio Pereira**

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DO ÔMEGA 3 RICO EM DHA  
EM CAMUNDONGOS C57BL/6 NO CURSO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM  
*P. berghei* NK65: ANÁLISE PULMONAR E INTESTINAL**

Juiz de Fora

2025

**Ludmila Ponce Monken Custódio Pereira**

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DO ÔMEGA 3 RICO EM DHA  
EM CAMUNDONGOS C57BL/6 NO CURSO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM  
*P. BERGHEI* NK65: ANÁLISE PULMONAR E INTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Imunologia e Doenças infectoparasitárias.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kézia Katiani Gorza Scopel

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ponce Monken Custódio Pereira , Ludmila .

Avaliação da suplementação dietética do ômega 3 rico em DHA em camundongos C57BL/6 no curso da infecção experimental com *P. berghei* NK65: Análise pulmonar e intestinal. / Ludmila Ponce Monken Custódio Pereira . -- 2025.

82 f. : il.

Orientadora: Kezia K. G. Scopel

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2025.

1. Malária grave. 2. Lesão pulmonar . 3. Acometimento intestinal .  
4. PUFA's ômega-3. I. K. G. Scopel, Kezia , orient. II. Título.

**Ludmila Ponce Monken Custódio Pereira**

**Avaliação da suplementação dietética do ômega 3 rico em DHA em camundongos C57BL/6 no curso da infecção experimental com *P. berghei* NK65: análise pulmonar e intestinal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e doenças infecto-parasitárias.

Aprovada em 24 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kezia Katiani Gorza Scopel** - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Flávia de Paoli**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque**

UNIRIO

Documento assinado digitalmente



CASSIANO FELIPPE GONCALVES DE ALBUQUER

Data: 25/11/2025 14:45:47-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Juiz de Fora, 04/11/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Kezia Katiani Gorza Scopel, Professor(a)**, em 24/11/2025, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavia de Paoli, Professor(a)**, em 24/11/2025, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2721355** e o código CRC **203CDA82**.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos, que de alguma forma, me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho me permitindo chegar no final desta etapa:

Primeiramente a Deus, por me guiar e proteger durante toda essa caminhada, me dando forças para superar todos os desafios.

Aos meus pais Bianca e Roberto e ao meu irmão Lucas que sempre estiveram do meu lado e me apoiaram em todas as decisões, tornando esse momento possível.

Às minhas avós, tios, tias e todos os outros familiares, pelos incentivos e dedicação que sempre tiveram por mim.

Ao meu namorado, Luiz Felipe, que sempre esteve ao meu lado me aconselhando nos momentos bons e nos ruins e me apoiando em todas as minhas escolhas. Aos meus amigos, em especial, Mariana e Maria Eduarda, que estiveram do meu lado durante todo o processo, aturando os meus surtos e sempre me incentivando a continuar. E a todos os outros que tornaram os meus dias mais felizes e deixaram essa caminhada mais leve. Obrigada por tanto!

Aos meus amigos/companheiros de laboratório José (Xu), Fernanda Martins (Fefa), Letícia (Lets), Ana Carolina (Carol), Fernanda Gonçalves e Thaís Bissoli por me acolherem, me ensinarem, me acompanharem e me ajudarem durante todo o desenvolvimento deste projeto. Vocês foram a melhor equipe que alguém poderia ter. Muito obrigada!!

À minha orientadora, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kézia K. G. Scopel que me acolheu no Laboratório de Parasitologia e não aceita menos que o nosso melhor. Obrigada por todos os momentos de aprendizado e crescimento que com certeza solidificaram minha formação acadêmica.

A todos os colaboradores deste trabalho, em especial, a Dr<sup>a</sup>. Juciane Maria de Andrade Castro, que me ajudou muito e esteve conosco em todos os nossos longos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo suporte financeiro e estrutural, que possibilitou a realização deste trabalho e a minha formação como pesquisadora.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e a todos os seus funcionários; ao Laboratório de Parasitologia e ao LIP (Laboratório Integrado de Pesquisa) por fornecerem todo o suporte necessário para o desenvolvimento do trabalho.

E, por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPEMIG, por possibilitarem o desenvolvimento desta pesquisa.

## RESUMO

A Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) é uma complicação da malária, que afeta entre 5% e 25% dos adultos infectados, e apresenta uma alta taxa de mortalidade mesmo com o uso de antimaláricos. Essa síndrome é provocada, entre outros fatores, por uma resposta imunológica exacerbada do organismo frente à infecção, podendo ocorrer independentemente da espécie de plasmódio infectante. Contudo, ainda não é reconhecido nenhum tratamento eficaz contra a SARA associada à malária (SARA-MA). Além disso, tem sido demonstrado que a infecção malárica também afeta o trato intestinal, resultando em lesões e distúrbios intestinais. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a suplementação com óleo de peixe rico em DHA foi capaz de minimizar os danos pulmonares em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, uma cepa que promove intensa inflamação e adesão de eritrócitos parasitados e leucócitos ao endotélio vascular. No entanto, não está estabelecido se a suplementação com altas doses de DHA possui efeito protetor contra a lesão pulmonar causada por outras cepas, como o *P. berghei* NK65 (PbN), que induz inflamação sistêmica sem promover exacerbada adesão endotelial. Diante da ausência de terapias específicas para a SARA-MA e das diferentes características patogênicas entre as cepas, este estudo avaliou se o óleo de peixe rico em DHA é capaz de modular a lesão pulmonar e as alterações intestinais provocadas pela infecção por PbN em modelo murino de infecção malárica. Para isso, camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram suplementados por via oral com 3 g/kg de ômega-3 rico em DHA durante 15 dias antes da infecção. A lesão pulmonar foi avaliada por meio de análises histológicas, avaliação da ocorrência de edema pulmonar e ensaios de permeabilidade alvéolo-capilar. O perfil inflamatório foi investigado por meio da dosagem de citocinas pró- e anti-inflamatórias em homogenato pulmonar. Também foram realizadas análises no lavado broncoalveolar para determinação da contagem total e diferencial de células, concentração de proteínas e produção de peróxido de hidrogênio, visando avaliar inflamação e estresse oxidativo. A caracterização fenotípica das células imunes pulmonares foi realizada por citometria de fluxo. Para análise da inflamação sistêmica foram conduzidas análises hematológicas (hemograma) e imunofenotipagem de células do baço. Para avaliação do trato intestinal foram realizadas análises morfológicas e funcionais do intestino, incluindo medidas intestinais e análise da permeabilidade intestinal. No âmbito pulmonar, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo suplementado com DHA e o grupo apenas infectado. Em contraste, a suplementação com ômega-3 rico em DHA impediu o encurtamento do intestino e reduziu, embora não de forma significativa, a permeabilidade. Esses resultados destacam a importância de considerar as diferenças nos perfis patogênicos entre cepas de *Plasmodium* ao investigar abordagens nutricionais ou imunomoduladoras.

**Palavras-chave:** malária grave, lesão pulmonar, PUFAs ômega-3

## ABSTRACT

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is a complication of malaria that affects between 5% and 25% of infected adults and has a high mortality rate even with the use of antimalarial drugs. This syndrome is caused, among other factors, by an exacerbated immune response of the body to infection and can occur regardless of the species of infecting *Plasmodium*. However, no effective treatment for malaria-associated ARDS (MA-ARDS) has yet been recognized. In addition, it has been shown that malaria infection also affects the intestinal tract, resulting in intestinal lesions and disorders. Recently, our group demonstrated that supplementation with DHA-rich fish oil was able to minimize lung damage in mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA, a strain that promotes intense inflammation and adhesion of parasitized erythrocytes and leukocytes to the vascular endothelium. However, it is not established whether supplementation with high doses of DHA has a protective effect against lung injury caused by other strains, such as *P. berghei* NK65 (PbN), which induces systemic inflammation without promoting exacerbated endothelial adhesion. Given the absence of specific therapies for MA-ARDS and the different pathogenic characteristics among strains, this study investigated whether DHA-rich fish oil is capable of modulating lung injury and intestinal changes caused by PbN infection in a murine model of malaria infection. For this purpose, female C57BL/6 mice were orally supplemented with 3 g/kg of DHA-rich omega-3 for 15 days prior to infection. Lung injury was assessed through histological analyses, evaluation of pulmonary edema occurrence, and alveolar-capillary permeability tests. Pro- and anti-inflammatory cytokine levels were measured in lung homogenate to evaluate the inflammatory response. Analyses were also performed on bronchoalveolar lavage fluid to determine total and differential cell counts, protein concentration, and hydrogen peroxide production to assess inflammation and oxidative stress. The phenotypic characterization of pulmonary immune cells was performed by flow cytometry. For the analysis of systemic inflammation, hematological analyses (complete blood count) and immunophenotyping of spleen cells were conducted. For the evaluation of the intestinal tract, morphological and functional analyses of the intestine were performed, including intestinal measurements and quantification of intestinal permeability. In the lungs, no statistically significant differences were observed between the DHA-supplemented group and the infected-only group. In contrast, supplementation with DHA-rich omega-3 prevented intestinal shortening and reduced, albeit not significantly, permeability. These results highlight the importance of considering differences in pathogenic profiles between *Plasmodium* strains when investigating nutritional or immunomodulatory approaches.

**Keywords:** severe malaria, lung injury, omega-3 PUFAs

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Mecanismos pelos quais os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 podem alterar a resposta imunológica.....	3
Figura 2	- Áreas com ocorrência de malária no mundo.....	7
Figura 3	- Risco de infecção por malária por município no Brasil.....	8
Figura 4	- Ciclo biológico das espécies de <i>Plasmodium</i> infectantes para o homem.....	11
Figura 5	- Patogênese da malária pulmonar grave.....	18
Figura 6	- Imunidade inata e adaptativa na fase sanguínea da malária.....	23
Figura 7	- Estratégia de gate utilizada para imunofenotipagem das células no pulmão.....	33
Figura 8	- Estratégia de gate utilizada para imunofenotipagem das células no baço.....	35
Figura 9	- Avaliação das condições clínicas, parasitemia sistêmica, sobrevivência, peso corporal e índices esplênico e hepático.....	38
Figura 10	- Avaliação dos parâmetros clínicos.....	39
Figura 11	- Análise das taxas de TGO e TGP no soro.....	39
Figura 12	- Avaliação da permeabilidade vascular, edema pulmonar, concentração de proteínas e histologia do tecido pulmonar.....	42
Figura 13	- Avaliação do infiltrado inflamatório e liberação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no lavado broncoalveolar.....	43
Figura 14	- Perfil fenotípico das populações celulares presentes no tecido pulmonar.....	44
Figura 15	- Imunofenotipagem das populações celulares no baço.....	45
Figura 16	- Dosagem de citocinas pró- e anti-inflamatórias no homogenato do tecido pulmonar.....	46
Figura 17	- Avaliação de alterações intestinais.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Análises hematológicas de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com <i>Pb. NK65</i> .....	41
----------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PbN	<i>Plasmodium berghei</i> NK65
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
TRAP	Proteína adesiva relacionada à trombospondina
CS	Proteína circunsporozoíta
GPI	Glicofosfatidilinositol
NFkB	Factor nuclear kappa B
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
MG	Malária grave
MC	Malária cerebral
PfEMP1	Proteína 1 da membrana eritrocitária do <i>Plasmodium falciparum</i>
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular 1
CD36	Cluster de diferenciação 36
CSA	Ácido Condroitim Sulfato A
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
IL-1	Interleucina -1
IL-8	Interleucina - 8
IL-6	Interleucina - 6
IL-10	Interleucina-10
ERONs	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
PRPs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
TLRs	Receptores do tipo Toll-like
RIG-1	Receptores do tipo RIG
NOD	Receptores do tipo NOD
IL-1 $\beta$	Interleucina - 1 $\beta$
IL-12	Interleucina 12
IFN- $\gamma$	Interferon gama

CD4	Cluster de diferenciação 4
CD8	Cluster de diferenciação 8
ALA	Ácido $\alpha$ -linolênico
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Ômega-3 e sua importância na saúde.....	1
1.1.1	Ômega-3 e tratamento contra doenças.....	3
1.2	Malária: breve histórico.....	5
1.3	Distribuição mundial da malária.....	6
1.4	O parasito e seu ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado.....	8
1.5	Malária complicada e não complicada.....	12
1.5.1	Malária pulmonar.....	15
1.5.2	Relação da infecção malárica com o ambiente intestinal.....	19
1.6	Resposta imune na malária.....	20
1.7	Utilização de modelo murino para estudos de malária grave.....	24
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo Geral.....	27
3.2	Objetivos Específicos.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	Camundongos, suplementação e infecção.....	28
4.2	Avaliação clínica, sobrevivência, parasitemia e análise hematológica... ..	28
4.3	Índices esplênico e hepático e Teste bioquímicos (TGO e TGP).....	29
4.4	Análise da integridade vascular alveolar.....	29
4.5	Lavagem broncoalveolar (LBA) para avaliação do perfil celular, concentração de proteínas e estresse oxidativo.....	30
4.6	Histopatologia.....	31
4.7	Isolamento e fenotipagem das células pulmonares.....	31
4.8	Isolamento e fenotipagem das células esplênicas.....	33
4.9	Dosagem de citocinas.....	35
4.10	Análise de alterações patológicas no intestino.....	36
4.11	Análise estatística.....	36
5	RESULTADOS.....	37
6	DISCUSSÃO.....	48
7	CONCLUSÃO.....	54
8	REFERÊNCIAS.....	55

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Ômega 3 e sua importância na saúde

Já se sabe que uma alimentação saudável e equilibrada é de extrema importância para um bom funcionamento do organismo, incluindo o sistema imunológico. Os lipídios presentes na dieta são fontes de ácidos graxos essenciais para o organismo humano, como os ácidos linolênico e  $\alpha$ -linolênico (ALA), que são sintetizados em plantas e podem ser encontrados na dieta humana como componente de algumas folhas verdes, nozes, sementes e óleos vegetais. Tais ácidos graxos são importantes para o balanço energético, biossíntese de membranas, produção de eicosanoides. Além disso, atuam na manutenção das funções cerebrais e transmissão de impulsos nervosos, participam da transferência do oxigênio para o plasma sanguíneo, da síntese de hemoglobina e da divisão celular. Os ácidos graxos essenciais não são sintetizados pelo organismo humano e, por isso, devem ser obtidos através da dieta (Martin et al., 2006).

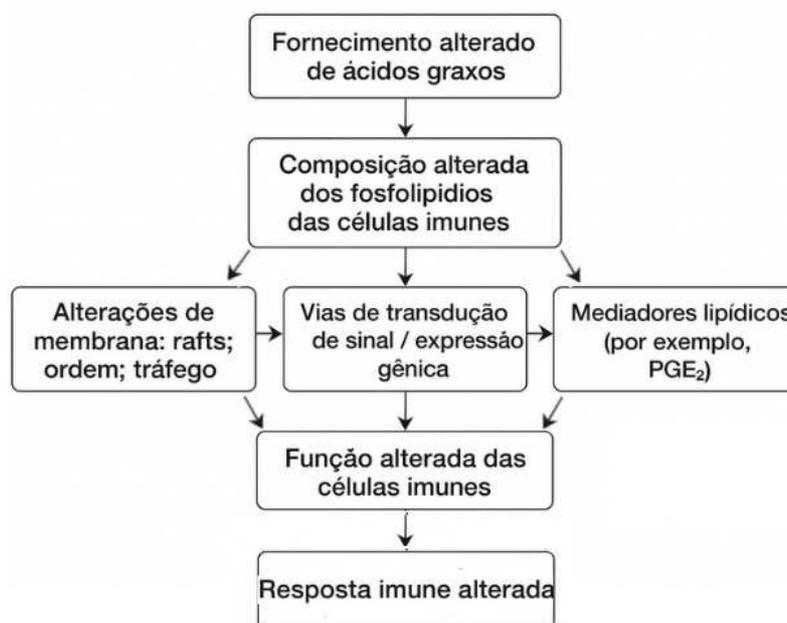
Os ácidos graxos podem ser classificados em ácidos graxos saturados, que são aqueles que não apresentam ligações duplas em sua cadeia hidrocarbonada, ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), que possuem uma dupla ligação na cadeia e, ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), que são aqueles que apresentam duas ou mais ligações duplas na sua cadeia hidrocarbonada (Calder, 2015). Os ácidos graxos da família ômega-3 (n-3) são ácidos graxos poliinsaturados caracterizados por apresentar a última ligação dupla entre os carbonos 3 e 4 na cadeia de hidrocarbonetos, contando o carbono metil terminal como número um. Dentre os ácidos graxos n-3 de cadeia longa encontram-se o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA), que estão presentes em grandes quantidades em peixes e outros frutos do mar (Calder, 2015) podendo ser sintetizados a partir do ALA pela ação de enzimas dessaturases e elongases (Sun et al., 2018), embora essa via metabólica não seja muito eficiente (Calder, 2015). Já os ácidos graxos n-6 são uma família de ácidos graxos poliinsaturados caracterizados por possuírem a última ligação dupla entre os carbonos 6 e 7 da cadeia, contando o carbono metil terminal como o número um. O principal ácido graxo n-6 é o ácido araquidônico (ARA), que é sintetizado a partir de ácidos graxos

n-6 mais simples, derivados de plantas, pela mesma via que ocorre a síntese de EPA (Calder, 2015).

Vários estudos sugerem que os seres humanos evoluíram com uma dieta equilibrada, ou seja, com as mesmas proporções de ácidos graxos essenciais n-3 e n-6. No entanto, nas dietas ocidentais modernas, essas proporções mudaram drasticamente, passando para uma dieta rica em ácidos graxos n-6 e deficiente em n-3 (Simopoulos, 2002). Contudo, já é bem estabelecido que quantidades excessivas de n-6 e uma proporção alta de n-6/n-3 resultam na patogênese de diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias e autoimunes. Já uma dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados da família n-3, com uma baixa proporção n-6/n-3, apresenta efeitos supressores na resposta imune (Simopoulos, 2002).

Nos últimos anos, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) da família do n-3, como o EPA e o DHA ganharam papel de destaque em muitos estudos, uma vez que apresentam importantes efeitos anti-inflamatórios, e atuam produzindo metabólitos pró-resolução como, protectinas, maresinas e resolvinas (Martin et al., 2006). Durante processos inflamatórios, são sintetizados, a partir de lipídios presentes nas membranas celulares, os eicosanoides, que são mediadores inflamatórios lipídicos (Rodriguez-Cruz; Serna, 2017). O ácido araquidônico, derivado do n-6, presente em grande quantidade nas membranas celulares, é utilizado para sintetizar eicosanóides, como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos que estão associados à atividade inflamatória (Calder, 2016). Entretanto, a suplementação dietética com ácidos graxos poliinsaturados da família do n-3 é capaz de modificar, de forma dependente do tempo e da dose, o perfil de ácidos graxos na membrana celular por meio da competição com outros ácidos graxos presentes na membrana quando em altas quantidades, dando origem a eicosanoides de perfil anti-inflamatório a partir do EPA e do DHA (Calder, 2016; Trebble et al., 2003). Além disso, esses lipídios podem se incorporar à membrana de células inflamatórias e interferir na organização dos domínios lipídicos conhecidos como rafts, o que impede a ativação do receptor Toll-like 4 (TLR-4) e, conseqüentemente, a sinalização da via mediada pelo fator de transcrição NF-κB, um dos principais reguladores da expressão de genes pró-inflamatórios. Ademais, o EPA e o DHA, uma vez mobilizados da membrana pela ação da enzima fosfolipase

A2, são capazes de ativar o fator de transcrição PPAR- $\gamma$  (receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama), que exerce efeito anti-inflamatório ao impedir a translocação do NF-kB para o núcleo, contribuindo para a supressão da resposta inflamatória exacerbada (Kong et al., 2010; Krey et al., 1997; Novak et al., 2003).



**Figura 1: Mecanismos pelos quais os ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 podem alterar a resposta imunológica.** A alteração no fornecimento de ácidos graxos é capaz de modificar a composição dos fosfolípidios das células imunes, causando alterações na membrana (balsas lipídicas - rafts, ordem e tráfego), nas vias de transdução de sinal/expressão gênica e nos mediadores lipídicos, o que resulta na alteração das funções das células imunes e, conseqüentemente, na resposta imune. Fonte: Adaptado de Calder, 2007.

### 1.1.1 Ômega 3 e tratamento contra doenças

Os estudos acerca dos efeitos anti-inflamatórios associados aos ácidos graxos poliinsaturados da família n-3 vêm crescendo ao longo dos anos. Já em 1980, Kromann e Green demonstraram que o alto consumo de n-3 estava associado à baixa incidência de doenças autoimunes e inflamatórias, como psoríase, asma e diabetes tipo 1 (Kronmann; Green, 1980). Anos depois, o conhecimento acerca da importância desses ácidos graxos na saúde continua se ampliando tanto no contexto nutricional quanto no da saúde, levantando hipóteses

quanto ao seu uso como terapia adjuvante no combate a doenças de diferentes etiologias.

Alguns estudos demonstraram, *in vitro*, que o tratamento com DHA foi capaz de impedir a destruição de células do sistema nervoso em infecções por Zika vírus (Braz-de-Melo et al., 2019). Além disso, já foi observado que moléculas de n-3 podem atuar na microbiota intestinal, uma vez que alteraram populações distintas de bactérias em pacientes tratados com cápsulas ou por meio da ingestão de alimentos ricos em n-3 (Costantini et al., 2017). Essa modulação da microbiota e os estímulos ao sistema imunológico resultam na melhora de quadros graves de doença celíaca e doença de Crohn (Costantini et al., 2017).

Ademais, os ácidos graxos da família do n-3 têm sido recomendados na terapia de pacientes com câncer, incluindo câncer de pulmão, devido a sua capacidade de inibir a progressão ou reduzir as complicações da doença (Vega et al., 2021). Além disso, foi demonstrado que a administração enteral de uma fórmula nutricional contendo PUFA's em pacientes com SDRA foi capaz de melhorar significativamente a oxigenação, a ventilação e a complacência pulmonar (Singer et al., 2009).

Em se tratando de doenças parasitárias, um estudo mostrou que pacientes chagásicos crônicos que receberam suplementação com cápsulas de óleo de peixe apresentaram aumento nos níveis séricos de IL-10, além de níveis reduzidos de triglicerídeos (Silva et al., 2017). Os estudos com espécies de *Plasmodium* datam de algumas décadas, mas pouco se sabe sobre os efeitos do n-3 nas formas graves da doença. Um trabalho mostrou que camundongos tratados com óleo de peixe e infectados com *P. berghei* e *P. yoelii* apresentaram aumento na sobrevivência e redução da parasitemia (Levander et al., 1989). Já Block e colaboradores demonstraram que camundongos infectados com *P. berghei* K173 e tratados com óleo de peixe, apresentaram aumento na sobrevivência e não desenvolveram malária cerebral, no entanto não houve redução na parasitemia circulante (Block et al., 1992). Recentemente nosso grupo demonstrou que a suplementação com óleo de peixe rico em DHA foi capaz de proteger camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA de desenvolver malária cerebral (Carpinter et al., 2024). Além disso, também demonstramos que a suplementação com óleo de peixe rico em DHA minimizou os danos pulmonares em camundongos

C57BL/6 infectados com *Pb. ANKA* (David-Vieira et al., 2024). No entanto, não está estabelecido se os efeitos observados nesta cepa podem ser extrapolados para outras cepas de *Plasmodium*, como *P. berghei* NK65.

## 1.2 Malária: breve histórico

A malária é uma doença parasitária de caráter infeccioso agudo causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Popularmente, a malária também é conhecida como febre terçã, febre quartã, paludismo ou maleita, entre outras denominações. Trata-se de uma das doenças mais antigas registradas na história, possivelmente presente entre os humanos há milhares de anos (Cox, 2010).

Embora existam relatos antigos sobre a malária, os plasmódios só foram descritos no final do século XIX pelo médico e pesquisador Alphonse Laveran. Durante a análise de amostras de sangue de pessoas infectadas, Laveran identificou pequenas estruturas pigmentadas dentro das células sanguíneas, utilizando lâminas de sangue fresco e lentes com ampliação de apenas 400x (Cox, 2010). Inicialmente, sua teoria de que a malária era causada por protozoários parasitas enfrentou forte resistência da comunidade científica. Muitos microbiologistas rejeitaram suas conclusões, e foram necessários sete anos de debates e demonstrações para que Laveran convencesse cientistas renomados como Louis Pasteur, Émile Roux e Robert Koch sobre a validade de sua descoberta. Em reconhecimento ao impacto de seu trabalho, Laveran recebeu, em 1907, o Prêmio Nobel de Medicina, consolidando sua contribuição à ciência e à compreensão da malária como uma doença parasitária (Bruce-Chwatt, 1981).

Estima-se que a introdução da malária no Brasil esteja associada à colonização europeia e ao tráfico de escravos, com estudos sugerindo que *Plasmodium falciparum* foi aqui inserido por volta de 1560 (Yalcindag et al., 2012). Diversos eventos históricos relacionados ao desenvolvimento do país contribuíram para a disseminação da doença. Após a abolição da escravatura, áreas previamente drenadas foram abandonadas, favorecendo o surgimento de criadouros de mosquitos. Além disso, atividades econômicas como a extração de

borracha e projetos de expansão territorial, incluindo a construção de ferrovias, levaram trabalhadores para o interior do Brasil e para a região amazônica, intensificando a propagação da malária e o surgimento de surtos registrados ao longo da história no país (Deane, 1986).

Diante disso, durante anos, médicos sanitaristas e pesquisadores, como Carlos Chagas e Oswaldo Cruz, foram frequentemente chamados para atuar em diferentes regiões endêmicas do Brasil, com o objetivo de controlar a disseminação da malária. As medidas profiláticas implementadas durante esse período se mantiveram em vigor por muitos anos, contribuindo significativamente para a quase erradicação da malária nas áreas extra-amazônicas do país. E foram a base para as ações que prevalecem atualmente em campanhas de eliminação da doença (Griffing et al., 2015).

### 1.3 Distribuição mundial da malária

Nos dias atuais, a doença ainda se apresenta como um grave problema de saúde pública, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2023, houve cerca de 263 milhões de casos e 597.000 mortes por malária em 83 países endêmicos (World Health Organization, 2024). A maior incidência de casos de malária ocorre na África, no Sudeste Asiático e nas Américas Central e do Sul. Dentre estas, a região africana é a detentora da maior concentração global de casos da doença: 94% dos casos (246 milhões) e 95% (569.000) das mortes causadas pela doença. Nesse continente o principal grupo de risco são crianças africanas de até 5 anos de idade (World Health Organization, 2024).

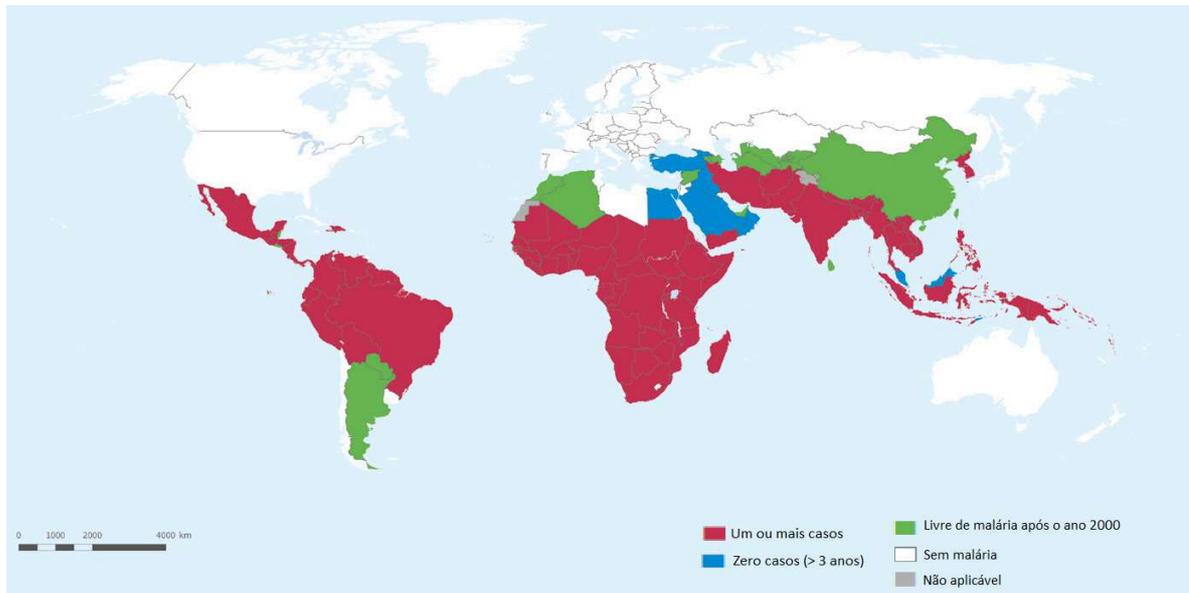
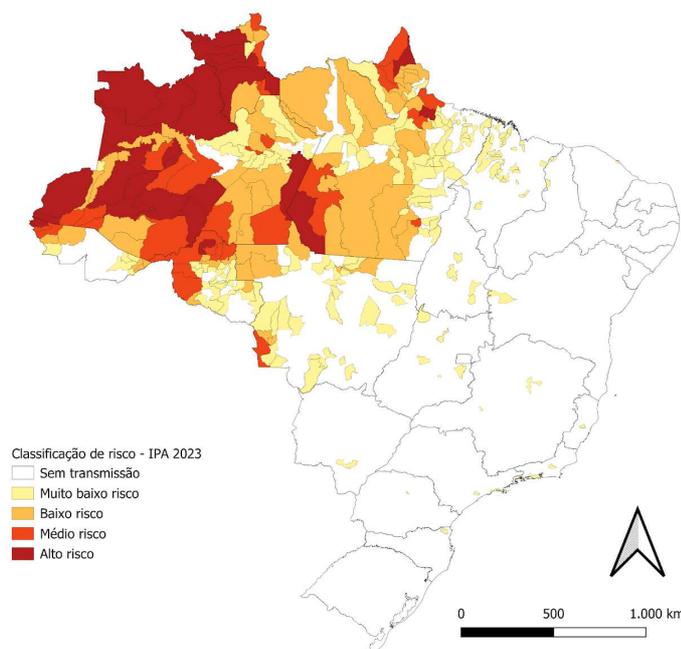


Figura 2: **Áreas com ocorrência de malária no mundo.** Distribuição dos casos de malária no mundo. Fonte: Adaptado de WHO, 2024.

Nas Américas, cerca de 505.600 casos e 116 mortes pela doença foram registrados em 2023. Com isso, entre os anos de 2015 e 2023 houve um aumento de 5% no número de casos reportados e uma redução de 31% no número de mortes por malária na região (World Health Organization, 2024).

No Brasil, a região amazônica, que compreende os estados do Acre, Amazonas, Pará, Amapá, Roraima, Rondônia, Tocantins, Maranhão e Mato Grosso, é considerada área endêmica para malária, com mais de 99% dos casos autóctones. Nas áreas fora da região amazônica, os casos registrados são importados dos estados pertencentes à área endêmica ou de países endêmicos (Ministério da Saúde, Brasil, 2024). Dados do Ministério da Saúde apontam reduções subsequentes na frequência de casos de malária a partir de 2019 até 2022, com a mais expressiva sendo de 18,4%, em 2019, quando foram registrados 153.268 casos autóctones. Em 2023, foram notificados 140.265 casos autóctones da doença, ou seja, houve um aumento de 8,8% em comparação ao ano anterior. Vale ressaltar que a pandemia de COVID-19, iniciada em 2020 impactou os programas de controle da malária, e, apesar do país ter apresentado uma redução de 19,1% no primeiro semestre de 2020, quando comparado com o mesmo período

de 2019, o Brasil enfrentou desafios com a interrupção de ações de controle vetorial em municípios endêmicos (Ministério da Saúde, Brasil, 2020). Apesar das dificuldades, a retomada gradual das ações resultou em estabilização e posterior redução dos óbitos associados à doença, que passaram de 58 em 2021 para 50 em 2022 e 63 em 2023 (Ministério da Saúde, Brasil, 2024).



Classificação da Incidência Parasitária Anual (IPA): Sem transmissão - 0 casos autóctones; Muito baixo risco - IPA <1 caso/1.000 habitantes; Baixo risco - IPA <10 casos/1.000 habitantes; Médio risco - IPA <50 casos/1.000 habitantes; Alto risco - IPA  $\geq$ 50 casos/1.000 habitantes.

Figura 3: **Risco de infecção por malária por município no Brasil.** Fonte: Sivep-Malária atualizado em 01/10/2024.

#### 1.4 O parasito e seu ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado

A malária é uma doença que possui como agente etiológico protozoários parasitos do gênero *Plasmodium*. Estes são organismos intracelulares obrigatórios que pertencem ao filo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Haemosporida e família Plasmodiidae (Antinori et al., 2012; Collins, 2012). Os representantes deste filo são caracterizados pela presença do complexo apical, que é um conjunto de estruturas e proteínas de grande importância na invasão celular (Gaur; Chitnis, 2011). O gênero abriga mais de 150 espécies, que em sua maioria são hospedeiro-específicas (Singh; Daneshvar, 2013), e dentre as espécies descritas,

apenas sete são capazes de infectar os seres humanos, sendo elas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium simium* e *Plasmodium cynomolgi* (WHO, 2024). Destas, *P. falciparum* apresenta maior morbidade e mortalidade, sendo responsável por causar a forma grave da doença (Wright, 2010), enquanto *P. vivax* possui maior distribuição e também pode causar as formas graves da doença e até mesmo levar ao óbito, mesmo que raramente (Lacerda, 2007). No Brasil, são registrados especialmente casos de malária pelas espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*. No final da década de 80, o número de casos de malária vivax ultrapassou os casos de malária falciparum e desde então tem sido a forma predominante, sendo responsável por mais de 80% dos casos de malária no país (Ministério da Saúde, Brasil, 2024). Nos últimos anos, porém, vem ocorrendo no sudeste do Brasil um aumento no número de casos de infecções humanas causadas por *P. simium* (Albuquerque et al., 2025), apesar de ter sido descrita inicialmente como espécie específica de primatas não humanos. Infecções por estas espécies são raras e relatadas como acidentais. No entanto, a frequência destas infecções pode estar sendo subnotificada devido à dificuldade na identificação dos parasitos durante o diagnóstico (Ashley; Pyae Phyo; Woodrow, 2018; Brasil et al., 2017).

Os plasmódios apresentam um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, necessitam de dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado (Garnham, 1966) (Figura 3). A doença é transmitida ao hospedeiro vertebrado através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* infectado. Esses insetos estão incluídos na ordem dos dípteros, na família Culicidae. No Brasil, as espécies encontradas são *Anopheles darlingi*, *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. cruzii* e *A. bellator* (FIOCRUZ, 2016), sendo a primeira o principal vetor, por apresentar ampla distribuição geográfica e hábitos antropofílicos com atividade durante a noite e picos nos crepúsculos matutinos e noturnos (Tadei; Thatcher, 2000).

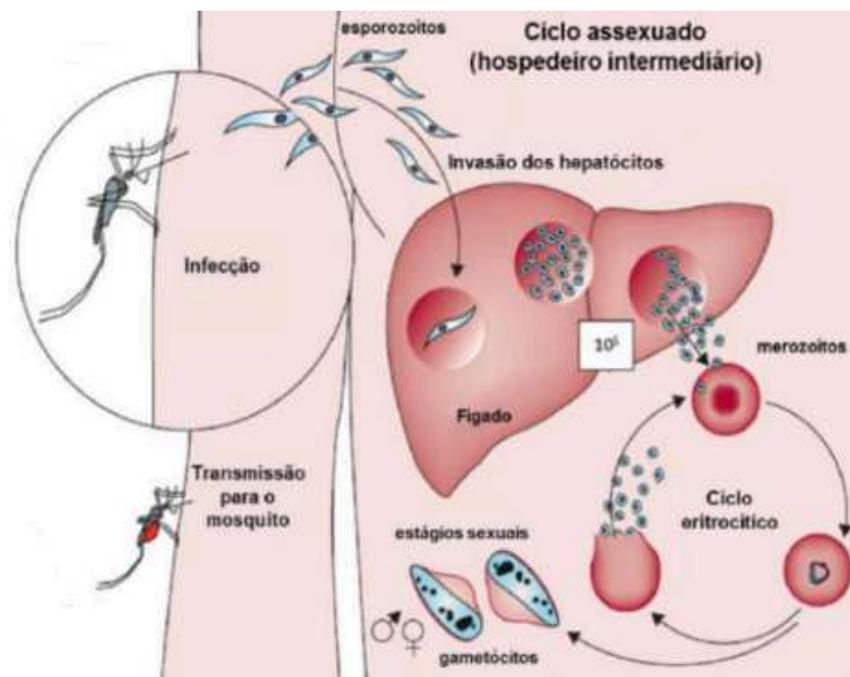
A infecção no hospedeiro vertebrado se inicia quando o inseto vetor infectado, durante o repasto sanguíneo, inocula esporozoítos na derme do hospedeiro. A saliva do mosquito contém substâncias vasodilatadoras que facilitarão a saída dos parasitos da derme e a passagem dos esporozoítos para a corrente sanguínea. No entanto, estes podem ficar retidos na derme, onde vão gerar uma resposta imune e serem degradados ou adentrarem os vasos linfáticos e

sofrerem degradação nos linfonodos (Amino et al., 2006). Entretanto, os parasitos, em sua maioria, conseguem invadir os vasos sanguíneos por meio de um movimento denominado “gliding”, que é proporcionado, principalmente, pela proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP) (Trottein et al., 1995) e pela proteína circusporozoíta (CS), ambas presentes na superfície do parasito (Cowman, 2016). Após alcançarem a corrente sanguínea, chegam rapidamente ao fígado, onde são capazes de invadir os hepatócitos (Amino et al., 2006). Esses organismos precisam atravessar os sinusoides hepáticos para alcançar os hepatócitos, utilizando as células de Kupffer como passagem. As células de Kupffer são macrófagos teciduais que fazem a ligação entre os sinusoides e os hepatócitos (Tavares et al., 2013), e embora tenham função fagocítica, são atravessadas ativamente pelos esporozoítos (Frevet et al., 2005). Estes são capazes de exercer algumas ações sobre as células do hospedeiro para que não sejam degradados e consigam alcançar os hepatócitos, como por exemplo, induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias ou a apoptose destas células, evitando que estas sejam capazes de processar o parasito e apresentar antígenos para as células do sistema imunológico do hospedeiro (Lindner; Miller; Kappe, 2012).

Nos hepatócitos, os esporozoítos dão origem a vacúolos parasitóforos através de invaginações da membrana plasmática da célula do hospedeiro e, dentro destes, se diferenciam em trofozoítos. Neste momento iniciam um estágio de reprodução assexuada denominada esquizogonia tecidual (Bano et al., 2007). Os trofozoítos dão origem a esquizontes e estes, posteriormente, originarão milhares de merozoítos hepáticos, formas invasivas para os eritrócitos. Os merozoítos hepáticos são liberados na corrente sanguínea envoltos em vesículas chamadas merossomas (Sturm et al., 2006). As espécies *P. vivax* e *P. ovale* desenvolveram a capacidade de formar hipnozoítos, que são formas latentes do parasito que permanecem nos hepatócitos, podendo causar a doença semanas ou até anos após a infecção, as chamadas recaídas tardias (Amino et al., 2006).

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos invadem rapidamente as hemácias e iniciam o processo de esquizogonia sanguínea (multiplicação assexuada), onde se transformam nas formas jovem e madura dos trofozoítos que, posteriormente, se diferenciam em esquizontes, que originarão merozoítos sanguíneos, que serão liberados para a infecção de novas hemácias. Ao longo do

processo de desenvolvimento dos parasitos no sangue, ocorre também a formação dos gametócitos masculino e feminino, que são as formas responsáveis pela reprodução sexuada do parasito e sua perpetuação no inseto vetor (Castro; Rodrigues, 2009). Durante a diferenciação, no momento em que ocorre o rompimento das hemácias, são liberados metabólitos como, glicofosfatidilinositol (GPI), moléculas presentes na superfície do parasito que são capazes de ativar o sistema imune através da via fator nuclear kB (NFkB), gerando uma resposta inflamatória por meio de macrófagos e produção de citocinas (Tachado et al., 1995); e hemozoína, também chamada de pigmento malárico, é um subproduto da metabolização da hemoglobina pelos parasitos. Nesse processo, os grupamentos heme são convertidos em uma substância não tóxica para o seu desenvolvimento (Arese; Schwarzer, 1997), no entanto, quando liberada na corrente sanguínea, esta atua como agente pirogênico, contribuindo para ativação de células do sistema imunológico, produção de citocinas e estimulando monócitos a produzirem TNF- $\alpha$ , acarretando picos febris característicos da doença (Shio et al., 2010). As febres, típicas na malária, ocorrem em 24 horas para *P. knowlesi*, 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 horas para *P. malarie* (De Souza; Riley, 2002).



**Figura 4: Ciclo biológico das espécies de *Plasmodium* infectantes para o homem.** Adaptado de White, N.J. e colaboradores, 2014. Os esporozoítos do parasito são

inoculados no hospedeiro, iniciam o ciclo hepático e geram merozoítos, que invadem hemácias e realizam o ciclo sanguíneo, onde há o desenvolvimento de trofozoítos e a formação de esquizontes, os quais geram novos merozoítos ou então levam à diferenciação dos gametócitos. Os gametócitos ingeridos pelo mosquito realizam o ciclo sexuado, gerando novos esporozoítos para infectar outro hospedeiro.

### 1.5 Malária complicada e não complicada

Independentemente da espécie de plasmódio infectante, a malária leva à manifestação de sintomas clínicos clássicos como paroxismo malárico, caracterizado por episódios de calafrios, febre e sudorese, muitas vezes acompanhados de mal-estar, náuseas e vômitos (França et al., 2008). No entanto, em casos em que não há tratamento ou que este é feito de forma ineficaz, ou casos em que o diagnóstico é tardio, a doença pode evoluir para formas graves (malária grave), na qual são comuns complicações como, anemia grave, trombocitopenia e manifestações renais, pulmonares e cerebrais, que podem levar ao óbito. Além disso, mulheres grávidas podem apresentar acometimento placentário (Tan et al., 2008). A malária grave ocorre mais frequentemente nas infecções por *P. falciparum*, mas também pode ocorrer em infecções por *P. vivax* e *P. knowlesi*. O desenvolvimento da doença depende de vários fatores relacionados tanto ao hospedeiro como à vulnerabilidade e o estado imunológico quanto ao parasito como a espécie infectante e a densidade parasitária (Gomes et al., 2011), além de questões sociais e geográficas (Miller et al., 2002). Tratando-se dos aspectos do hospedeiro, as condições de risco para o desenvolvimento de malária grave (MG) compreendem incluem idade inferior a 6 meses, entre 5 anos, ou superior a 65 anos, gravidez, estado imunológico comprometido, ausência de profilaxias contra a doença, tratamento inadequado e o estado da doença no momento da admissão (Trampuz et al., 2003). Contudo, as manifestações graves afetam, principalmente, crianças africanas que vivem em locais com difícil acesso aos serviços de saúde, e os óbitos nessa faixa etária estão normalmente associados à anemia grave e à malária cerebral (MC) (Marsh et al., 1996). Com isso, a maioria dos óbitos registrados por malária estão relacionados à infecção por *P. falciparum*.

Contudo, óbitos por *P. vivax* vêm sendo cada vez mais notificados, inclusive no Brasil (Trampuz et al., 2003).

Dentre as complicações decorrentes da malária grave destacam-se:

a. A anemia grave ocorre mais frequentemente nas infecções por *Plasmodium vivax*, acomete principalmente crianças, mas também pode ocorrer em adultos. Durante a infecção malárica, os parasitos rompem as hemácias infectadas levando-as à destruição. No entanto, sabe-se que o principal mecanismo relacionado à anemia grave é a destruição tanto das hemácias parasitadas quanto das saudáveis no baço (Abdalla, 1988). Há evidências de que para cada hemácia destruída na infecção por *P. falciparum*, 35 são destruídas na infecção por *P. vivax* e que essa destruição ocorre devido a alterações na membrana das células, resultando em mudanças no formato, além da expressão de proteínas do parasito, que levam à fagocitose pelas células imunológicas presentes no baço (Abdalla, 1988). Nas hemácias saudáveis, a adsorção de antígenos e substâncias resultantes do metabolismo do parasito na membrana da célula leva à sua destruição pelo baço, especialmente durante a infecção (Engwerda et al., 2005). Outro fator importante é a produção de citocinas e de hemozoína pelos parasitos, uma vez que estes influenciam na produção de células na medula óssea, resultando em uma eritropoiese ineficaz (Casals-Pascual et al., 2008). Nesse sentido, a anemia grave pode acarretar quadros de hipóxia tecidual e acidose metabólica (White, 2018).

b. A acidose metabólica é caracterizada pelo acúmulo de ácido láctico, derivado da quebra da glicose por via anaeróbica (Day et al., 2000). Durante a infecção malárica isso ocorre devido à obstrução dos capilares pelas hemácias parasitadas, que resulta na falta de oxigenação tecidual, levando as células a realizarem respiração anaeróbica (Ashley et al., 2018). O acúmulo de ácidos no organismo causa danos teciduais, uma vez que altera a estrutura de enzimas, levando à inibição de funções enzimáticas, e também de proteínas essenciais para o metabolismo (Day et al., 2000).

c. A trombocitopenia é uma manifestação hematológica comum na malária, especialmente quando causada por *P. vivax* (Lacerda et al., 2011). Estudos sugerem que uma hipótese para a ocorrência de plaquetopenia é o sequestro de plaquetas no baço, como resultado da ligação específica de IgG a antígenos maláricos ligados a plaquetas (Grau et al., 1988). Além disso, um estudo realizado

em humanos mostra que os mecanismos relacionados à trombocitopenia na malária são destruição periférica, intenso sequestro de plaquetas no baço e uso excessivo de plaquetas associado ao fenômeno da coagulação intravascular disseminada (Gupta et al., 2013).

d. Em relação à falência renal, esta ocorre mais frequentemente em adultos com malária grave e é caracterizada por uma disfunção homeostática que ocorre devido à incapacidade de levar um balanço ácido-base por meio da produção de íons de bicarbonato, interferindo na concentração de ácidos no organismo (Wassmer; Grau, 2016). O comprometimento renal pode ocorrer devido a diversos fatores como o acúmulo de complexos imunológicos nos glomérulos (Wassmer; Grau, 2016), em razão da hemólise de hemácias parasitadas e não parasitadas, além da hipóxia tecidual resultante da adesão de eritrócitos parasitados e também ao desenvolvimento de sepse e icterícia, que são causadas pelo aumento dos níveis séricos de bilirrubina (Mathew; George, 2011).

e. Se tratando da malária placentária, esse quadro se desenvolve, principalmente, quando mulheres grávidas são expostas, pela primeira vez, à infecção por *P. falciparum*. No entanto, estudos demonstraram que mesmo sem evidência direta de parasitos ou pigmento malárico na placenta, mulheres grávidas expostas a *P. vivax* apresentaram alterações histopatológicas significativas na placenta (Souza et al., 2013). Nas infecções por *P. falciparum* os parasitos expressam na superfície dos eritrócitos parasitados a PfEMP-1, que se liga à condroitina sulfatada A (CSA) presente na placenta (Rogerson et al., 1995). Esse quadro pode acarretar prejuízos no desenvolvimento fetal, levando ao nascimento prematuro do bebê, assim como o nascimento com baixo peso ou até mesmo o óbito da criança. Além disso, a mãe pode desenvolver anemia grave, ou ir a óbito devido a ocorrência de hemorragias (Centrals for Disease Control and Prevention, 2021).

f. A malária cerebral ocorre, principalmente, nas infecções por *P. falciparum* e apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade, uma vez que o rápido desenvolvimento do quadro clínico leva os pacientes ao coma ainda nas primeiras 24 horas após o aparecimento dos sintomas. Ademais, ainda podem ocorrer o aumento da pressão intracraniana, convulsões, confusão mental, ataxia e paralisia parcial (Boivin et al., 2007; Idro et al., 2005). Esse quadro é caracterizado pela

adesão de eritrócitos parasitados ao endotélio de microvasos da circulação sanguínea cerebral, por meio das proteínas de superfície (PfEMP-1) expressas na membrana das células parasitadas (Engwerda et al., 2005). Além disso, a formação de rosetas, aglomerados celulares e leucócitos também desempenha papel importante no processo de obstrução (Pain et al., 2001; De Souza et al., 2010). A obstrução dos capilares resulta no impedimento do fluxo sanguíneo no local, que pode levar à hipóxia tecidual, aumento da pressão intracraniana com edema cerebral, ativação endotelial, rompimento da barreira hematoencefálica, hemorragias e disfunção no processo de coagulação (Wassmer et al., 2008).

### 1.5.1 Malária Pulmonar

O sistema respiratório é composto pelas vias aéreas e pelos pulmões, e estes são responsáveis pela respiração, ou seja, entrada e saída de ar. Essa troca de gases é essencial para o funcionamento dos tecidos e órgãos do corpo. A entrada de oxigênio e a eliminação de dióxido de carbono são processos essenciais para a manutenção da homeostase, além disso, também influenciam na manutenção do equilíbrio ácido-base, fonação, olfato e termorregulação (perda de calor) (Dormans, 1996).

A ventilação pulmonar depende da interação entre o gradil costal, músculos do tronco e abdômen e a resistência das vias aéreas, o que permite que o ar entre e saia dos pulmões por meio de diferenças de pressão, chegando até os alvéolos, onde ocorre a troca de gases entre o ar e o sangue, processo denominado hematose (Dormans, 1996; Constanzo, 2014). O ar percorre inicialmente as zonas condutoras, que são constituídas por brônquios e bronquíolos que se ramificam até alcançar a zona respiratória. Essas vias são revestidas por células ciliadas e secretoras de muco que são responsáveis por conduzir, aquecer, umidificar e filtrar o ar, removendo partículas inaladas (Constanzo, 2014). Além disso, a musculatura lisa dessas vias é inervada pelo sistema nervoso simpático, cujos receptores  $\beta_2$  promovem relaxamento e dilatação, e também pelo sistema nervoso parassimpático, que, através de receptores muscarínicos, induz constrição, aumentando a resistência ao fluxo de ar (Dormans, 1996).

A zona respiratória é composta por bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares, que contêm alvéolos, que são estruturas especializadas na troca gasosa. Cada pulmão apresenta milhões de alvéolos, cujas paredes delgadas e extensas facilitam a difusão de oxigênio para o sangue e a eliminação de dióxido de carbono (Dormans, 1996; Costanzo, 2014). Os alvéolos são revestidos por células epiteliais denominadas pneumócitos tipo I, responsáveis pela troca gasosa, e pneumócitos tipo II, que produzem surfactante pulmonar, substância essencial para reduzir a tensão superficial e prevenir o colapso alveolar (atelectasia) (Constanzo, 2014; Freddi et al., 2013). Além disso, também estão presentes macrófagos alveolares, que são responsáveis pela remoção de partículas e detritos celulares, mantendo a integridade alveolar (Constanzo, 2014).

A perfusão alveolar ocorre por meio dos capilares derivados da artéria pulmonar, cuja resistência é modulada por fatores locais, principalmente a concentração de oxigênio (Dormans, 1996). Paralelamente, a circulação brônquica fornece sangue para as vias condutoras, embora não participe das trocas gasosas (Freddi et al., 2013). Desta maneira, alterações na ventilação, perfusão, trocas gasosas ou estrutura pulmonar, como as que podem ocorrer durante a infecção malárica, podem comprometer a oxigenação tecidual e gerar efeitos sistêmicos significativos.

Embora o dano tecidual pulmonar associado à malária seja descrito há mais de dois séculos, o entendimento dos mecanismos envolvidos na patologia, assim como das abordagens terapêuticas mais eficazes, ainda permanece limitado. As complicações pulmonares se apresentam como uma das manifestações mais graves da doença (Brooks et al., 1968), e são comuns em infecções causadas por *P. falciparum* e *P. vivax* (Tan et al., 2008), porém podem ocorrer em decorrência da infecção por *P. ovale* (Haydoura et al., 2010), *P. malarie* (Lozano et al., 1983) e *P. Knowlesi* (William et al., 2011). Os pacientes podem apresentar desde manifestações clínicas discretas relacionadas às vias aéreas superiores até complicações graves como hipoxemia grave, edema pulmonar, lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (Taylor et al., 2012).

A SARA pode ocorrer simultaneamente a outras síndromes como a malária cerebral (Blanloeil et al., 1980; Taylor et al., 2006; Taylor; White, 2002), ou de forma

isolada, principalmente em adultos, com uma frequência de 5% a 25%, e em até 29% em mulheres grávidas. Alguns estudos têm mostrado que pacientes com malária grave desenvolveram SARA, durante ou após o tratamento com antimaláricos, quando já não apresentavam mais parasitemia detectável, o que sugere que fatores do hospedeiro estão associados à patogênese da síndrome. Além disso, alguns antígenos do parasito podem permanecer por algum tempo no organismo mesmo após o tratamento da doença (Taylor et al., 2012).

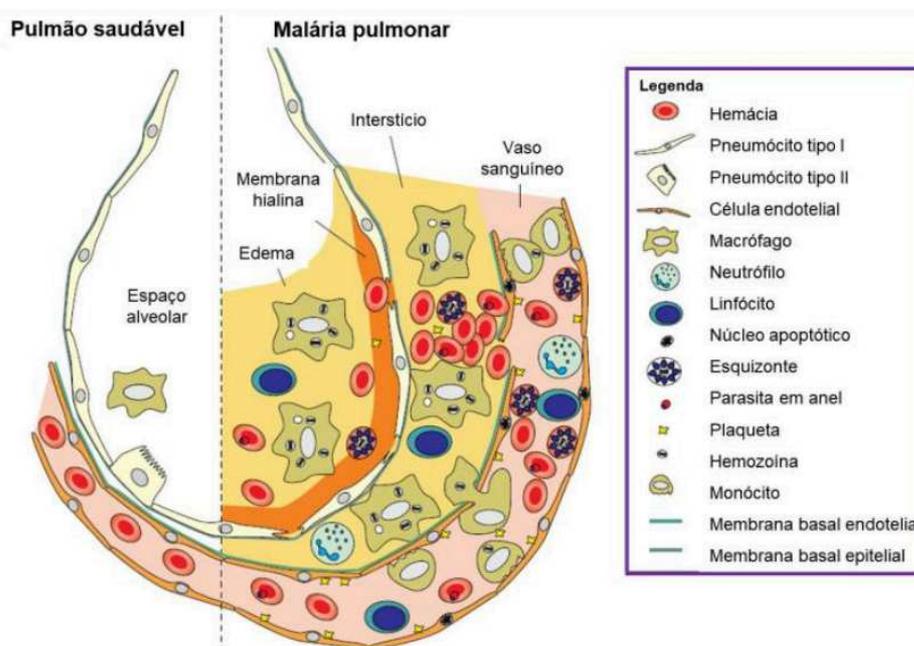
A manifestação pulmonar mais frequente durante a infecção malárica é o edema pulmonar (Figura 4), caracterizado pelo aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, o que promove a perda de fluido do compartimento intravascular para o espaço alveolar, acarretando o acúmulo de líquido nos alvéolos (Taylor et al., 2006; Taylor e White, 2002). Esse processo é acompanhado pelo influxo de macrófagos e ativação de uma resposta inflamatória intravascular. Neste contexto, a resposta imune local pode contribuir para a obstrução das vias aéreas, comprometendo a ventilação e as trocas gasosas (Anstey et al., 2002; Taylor et al., 2006).

Sabe-se que nas infecções por *P. falciparum*, o desenvolvimento da SARA está relacionado ao sequestro de hemácias parasitadas na microvasculatura periférica (Anstey et al., 2007), o que resulta na obstrução da microcirculação pulmonar, levando a uma resposta inflamatória exacerbada, marcada pela intensa migração de células inflamatórias para o tecido pulmonar e elevada produção de citocinas. As citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1, liberadas por monócitos e macrófagos, induzem a expressão de mediadores inflamatórios como IL-6 e CXCL-8/IL-8, além de induzir o aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial e estimular a ativação de macrófagos (MacPherson et al., 1985; Mohan et al., 2008; Taylor;White, 2002). Ademais, os leucócitos como macrófagos e neutrófilos recrutados para o tecido contribuem para a formação, em excesso, de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), gerando estresse oxidativo (Wink et al., 2011).

No entanto, nas infecções por *P. vivax*, a adesão ainda não é bem compreendida. Embora alguns estudos recentes mostrem que *P. vivax* é capaz de aderir ao endotélio, a intensidade com que esse fenômeno ocorre é bem menor em comparação a *P. falciparum* (Carvalho et al., 2010). Com isso, somente a obstrução

vascular não explica o desenvolvimento de SARA na malária vivax. Somado a isso, um estudo mostrou que o comprometimento pulmonar foi a principal causa de óbito em infecções por *P. vivax*, associado a um intenso infiltrado inflamatório e à ocorrência de edema pulmonar (Lacerda et al., 2012). Neste contexto, pode ser observado que a infiltração celular e a resposta inflamatória local desempenham papéis importantes na patogênese da injúria pulmonar.

O quadro clínico pode evoluir rapidamente para insuficiência respiratória, sendo o diagnóstico muitas vezes dificultado pela semelhança com os sintomas de pneumonia. Os pacientes com SARA-MA apresentam sintomas clínicos como tosse, dor torácica, dispneia intensa, expectoração e desconforto respiratório acentuado (Rajput et al., 2000). No entanto, ainda não é reconhecido pela OMS nenhum tratamento adicional contra a SARA-MA.



**Figura 5: Patogênese da malária pulmonar grave.** A infecção malária promove uma resposta imunológica exacerbada caracterizada pela presença de cristais de hemozoína, frequentemente fagocitados por células do sistema imune, que contribuem para o desenvolvimento da inflamação pulmonar. Além disso, pode ser observado intenso infiltrado inflamatório, com predominância de monócitos e macrófagos, além da presença de plaquetas nos vasos sanguíneos, no tecido intersticial e nos alvéolos. A lesão e a apoptose das células endoteliais culminam no aumento da permeabilidade vascular e em micro-hemorragias. Entre as alterações histopatológicas identificadas, destacam-se a

formação de membranas hialinas, o edema alveolar e o espessamento do espaço intersticial. Fonte: Adaptado de Van de Steen et al., 2013.

### 1.5.2 Relação da infecção malárica com o ambiente intestinal

A malária é uma infecção sistêmica que causa lesões ou disfunções em diferentes órgãos (Sey et al., 2020). Alguns estudos já relataram a ocorrência de sintomas gastrointestinais, incluindo náuseas, vômitos e diarreia em pacientes com malária vivax (Song et al., 2003). Além disso, já se sabe que, principalmente em casos de malária grave, a infecção também pode aumentar a probabilidade dos pacientes desenvolverem infecções bacterianas graves, uma vez que alteram o sistema imunológico, causando um desequilíbrio intestinal, o que faz com que o organismo fique mais vulnerável a outras infecções, principalmente por enteropatógenos invasivos. Essas são bactérias que atacam o intestino e conseguem alcançar a corrente sanguínea (Church; Maitland, 2014). Este quadro ocorre em cerca de 6,5% das infecções graves de malária e apresenta uma alta taxa de mortalidade (Bronzan et al., 2007).

Diante disso, vários estudos vêm tentando elucidar os mecanismos envolvidos nessas patologias, uma vez que a relação entre malária e distúrbios gastrointestinais ainda não é bem compreendida. Um estudo realizado com ratos mostrou associação entre infecção malárica e inflamação cecal, aumento da permeabilidade intestinal, infiltração mononuclear e mastocitose (Mooney et al., 2015; Alamer et al., 2019; Chau et al., 2013). Ademais, Taniguchi e colaboradores demonstraram que a infecção de camundongos C57BL/6 por *Plasmodium berghei* ANKA, cepa do parasito responsável por causar malária grave em roedor, levou a alterações patológicas, especialmente na porção do intestino delgado, caracterizadas por extensão da largura e encurtamento das vilosidades e sangramento decorrente da ruptura das vilosidades ou outros componentes da mucosa. Esses achados foram acompanhados da ocorrência de permeabilidade intestinal e alteração da microbiota (Taniguchi et al., 2015; Karney e Tong, 1972).

A alteração na composição da microbiota (disbiose) intestinal pode enfraquecer as barreiras protetoras, contribuindo para infecções. Nesse sentido, estudos em humanos já demonstraram que a microbiota intestinal é capaz de

modular a resposta imune durante a infecção malárica, atuando na produção de anticorpos e na inflamação (Elliot et al., 2022). Em trabalhos realizados com camundongos, a disbiose foi capaz de alterar a gravidade da infecção por *Plasmodium*. Atualmente acredita-se que alterações na microbiota intestinal, na permeabilidade da mucosa intestinal e produção de metabólitos microbianos podem modular a resposta inflamatória sistêmica, o que pode influenciar a gravidade das injúrias pulmonares. Isso ocorre devido ao eixo intestino-pulmão, uma via bidirecional de comunicação entre o trato gastrointestinal e os pulmões, mediada por fatores imunológicos, microbianos e metabólicos (Budden et al. 2017).

Neste contexto, muitos estudos sugerem que as manifestações gastrointestinais decorrentes da malária são causadas pelos produtos liberados pelas células do sistema imune como citocinas pró-inflamatórias, principalmente fator de necrose tumoral (TNF) e pelas espécies reativas de oxigênio, que desempenham papel de destaque no dano endotelial e epitelial. (Clark, 1987; Parks; Bulkley; Granger, 1983). Além disso, durante a infecção também ocorre o acometimento do fígado e do pâncreas, o que interfere no processo de absorção (Karney; Tong, 1972; Segal et al., 1974).

Sendo assim, terapias que visem reduzir o processo inflamatório durante as infecções maláricas são de grande importância para minimizar os danos gastrointestinais causados pela doença.

## 1.6 - Resposta imune na malária

O reconhecimento do parasito pelo sistema imune do hospedeiro desencadeia uma resposta inflamatória intensa e imediata, com o objetivo de conter a infecção. No entanto, essa ativação rápida e robusta da imunidade inata está fortemente relacionada às manifestações clínicas da malária, seja de forma direta ou ao potencializar os efeitos da resposta imune adaptativa (Schofield, 2007; Stevenson; Riley, 2004). Contudo, vale destacar que indivíduos expostos repetidamente à infecção malárica desenvolvem uma imunidade natural. Nesses indivíduos hiperimunes, a parasitemia tende a ser baixa, o que impede a ativação exacerbada das células da imunidade inata e, conseqüentemente, a infecção permanece assintomática (Gazzinelli et al., 2014).

A ativação da resposta imune inata depende do reconhecimento direto de moléculas microbianas denominadas Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Além disso, a infecção pode promover danos celulares e teciduais, que acarretam a liberação de componentes endógenos do hospedeiro conhecidos como Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), que também contribuem para a amplificação da resposta inflamatória. Tanto PAMPs quanto DAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRPs) que são expressos pelas células do sistema imune inato (Broz; Monack, 2013; Stuart et al., 2013). Dentre os PRRs, os receptores Toll-like (TLRs) detectam PAMPs localizados na membrana plasmática ou em endossomos, já os receptores do tipo RIG-I (RLRs) e os do tipo NOD (NLRs) atuam no citosol. Quando ativados, esses receptores induzem diferentes programas transcricionais e acionam múltiplas vias de sinalização envolvidas na resposta imune e na eliminação do patógeno. Portanto, a ativação exacerbada acarreta em inflamação sistêmica e danos teciduais (Gazzinelli et al., 2014).

Os PAMPs que apresentam grande destaque na infecção malárica são: as âncoras glicofosfatidilinositol (GPI), que são essenciais para a viabilidade do parasito, que são responsáveis por ancorar a maioria das proteínas de superfície à membrana plasmática do protozoário (Almeida; Gazzinelli, 2001). Além disso, atuam induzindo a produção de citocinas por macrófagos. Em macrófagos murinos, a ativação de receptores Toll-like por GPIs promove a síntese de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Gazzinelli; Denkers, 2006; Schofield; Hackett, 1993; Tachado et al., 1996). E, nas células endoteliais, essa ativação leva à expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, além de também induzir a produção de óxido nítrico (Schofield et al., 1996); e a hemozoína (Hz), produzida pelos parasitos, a partir da metabolização da hemoglobina, que libera heme livre, que é convertida em cristais de hemozoína (Jani et al., 2008; Nguyen et al., 1995). As hemácias parasitadas contendo Hz são fagocitadas por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas em órgãos como baço, fígado e cérebro. A quantidade de hemozoína acumulada nos fagócitos está diretamente relacionada à carga parasitária e coincide com os episódios de febre e elevados níveis séricos de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , o que torna

a hemozoína um potencial biomarcador de gravidade da malária (Nguyen et al., 1995).

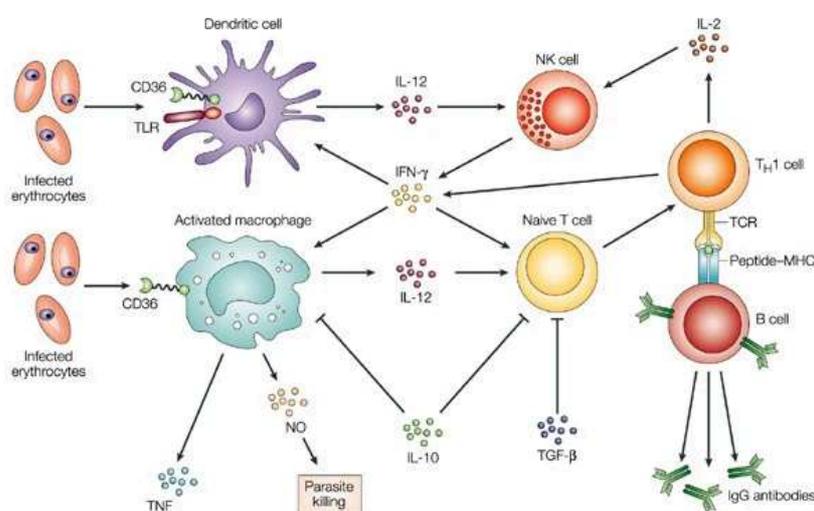
Sendo assim, o sequestro de hemácias parasitadas e a liberação de toxinas decorrentes da lise de eritrócitos estimulam células mononucleares a produzirem citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ , promovendo a ativação de células NK, macrófagos e linfócitos T (Artavanis-Tsakonas et al., 2003). As células NK, embora importantes no controle da parasitemia, não eliminam completamente o parasito (Stevenson; Riley, 2004). Em relação aos macrófagos, esses podem ser residentes ou infiltrantes (derivados de monócitos circulantes), e ambos desempenham papel importante na defesa, homeostase ou reparo (Varol et al., 2015; Morales-Nebreda et al., 2015). Essas células apresentam plasticidade e podem se diferenciar em macrófagos de perfil M1, quando estimulados por PAMPs, DAMPs e citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , apresentando alta atividade microbicida e tumoricida e secretando citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e óxido nítrico (Mantovani et al., 2005). No entanto, em casos de malária grave, ocorre uma hiperativação, resultando na produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, o que acarreta lesões teciduais (Gazzinelli et al., 2014). Já os macrófagos de perfil M2 estão relacionados a processos de regulação e reparo (Martinez; Gordon, 2014).

Os neutrófilos são células abundantes na circulação e atuam como primeira linha de defesa contra patógenos. Eles migram para os tecidos por meio da interação com moléculas endoteliais e são capazes de eliminar o patógeno por meio de fagocitose, degranulação ou formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) (Ley et al., 2018; Giacalone et al., 2020).

Se tratando das células linfóides, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> atuam principalmente contra formas hepáticas do parasito, produzindo TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e eliminando os parasitos através da produção de óxido nítrico e de grânulos de granzimas e perforinas (Montes de oca et al., 2016). Essas células são ativadas a partir de IL-2, sintetizadas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Amante et al., 2010). Estes apresentam papel importante na resposta contra o parasito uma vez que auxiliam as células B na produção de anticorpos de alta afinidade e também ativam células T CD8<sup>+</sup> e macrófagos (Pinzon-Charry et al., 2010; Stanisic; Good, 2015). Portanto, ambas as populações podem contribuir para o agravamento da doença ao estimularem a

inflamação tecidual e resultando no aumento das lesões, além de contribuir para o aumento da adesão de células ao endotélio (Amante et al., 2010; Hermesen et al., 1997).

Considerando que a resposta imunológica à malária é intensa e pode contribuir para a geração de danos, a modulação dessa resposta, com foco na redução do potencial inflamatório, aliada à eliminação dos parasitos, é de grande importância para aumentar a sobrevivência dos pacientes e minimizar as sequelas associadas à doença.



**Figura 6: Imunidade inata e adaptativa no estágio sanguíneo da malária.** Em resposta ao reconhecimento de antígenos parasitários ou produtos advindos de seu metabolismo por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como receptores Toll-like (TLRs) e CD36, ou citocinas inflamatórias, como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), as células dendríticas (DCs) amadurecem e migram para o baço (principal local de respostas imunes contra o Plasmodium em estágio sanguíneo). Durante esse processo de maturação, elas aumentam a expressão de moléculas importantes para ativar outras células do sistema imune (como MHC II, CD40, CD80 e CD86) e passam a produzir citocinas, como a interleucina-12 (IL-12). A IL-12 estimula as células natural killer (NK) a produzirem IFN- $\gamma$  e auxilia na diferenciação de células T CD4+ em células Th1. O IFN- $\gamma$  produzido pelas NK também contribui para o amadurecimento das DCs e reforça os sinais de ativação induzidos pelo parasito, promovendo a multiplicação de células T CD4+ específicas para o antígeno. Além disso, as células Th1 liberam IL-2, que estimula ainda mais as NK a produzirem IFN- $\gamma$ , o que ativa os macrófagos e amplia a resposta imune adaptativa. Por outro lado, citocinas

como IL-10 e TGF- $\beta$  têm um papel regulador, controlando e limitando as respostas imunes inata e adaptativa. Fonte: Adaptado de Stevenson et al., 2004.

### 1.7 Utilização de modelo murino para estudos de malária grave

Diante das dificuldades éticas em se estudar os processos patológicos associados à malária grave, a utilização de modelos animais experimentais vem sendo cada vez mais importante. As espécies de *Plasmodium* que infectam roedores são muito utilizadas como modelos experimentais para a malária humana, e as combinações entre espécies de *Plasmodium* e linhagens de camundongos permitem o estudo de diferentes manifestações patológicas relacionadas à doença (Lovegrove et al., 2008; Pamplona et al., 2009; Van den Steen et al., 2010). As espécies de parasitos que infectam murinos, dentre elas *P. berghei*, *P. yoelli* e *P. chabaudi*, vêm sendo amplamente utilizadas para investigar as interações imunológicas no hospedeiro, possibilitando a identificação de diversos fatores envolvidos na resposta imune contra a infecção malárica (Niikura; Inoue et al., 2011). Neste contexto, modelos que mimetizam aspectos da malária cerebral, malária placentária e anemia grave humana já estão bem estabelecidos (Stevenson et al., 2004; Neres et al., 2008; De Souza; Riley, 2002).

Recentemente, têm sido propostos modelos murinos para o estudo dos mecanismos relacionados à SDRA-MA. Lovegrove e colaboradores, em 2008, demonstraram que camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA apresentaram inflamação do septo e ruptura da membrana alvéolo-capilar. Além disso, mostraram edema pulmonar rico em proteínas, dependente de sequestro de hemácias parasitadas e da molécula de adesão CD36. No entanto, não foi observada migração de leucócitos para o espaço alveolar (Lovegrove et al., 2008). Outros trabalhos também utilizam a associação entre *P. berghei* ANKA e C57BL/6 para estudar as complicações pulmonares associadas à malária grave (Souza et al., 2013), no entanto esta associação já é bem estabelecida para estudos de malária cerebral, complicação caracterizada por manifestações características e uma alta taxa de mortalidade dos camundongos entre 6 e 8 dias após a infecção (Amante et al., 2010). Sendo assim, mesmo que os animais apresentem indícios de SARA no início da infecção, vão ao óbito devido a MC,

impossibilitando estudos mais aprofundados acerca da síndrome pulmonar (Souza et al., 2013).

Em 2010, Van den Steen e colaboradores sugeriram um modelo experimental com camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com *P. berghei* NK65. Nesta associação os animais não desenvolvem manifestações cerebrais, no entanto, apresentam aumento do peso dos pulmões, edema pulmonar rico em proteínas e formação de membrana hialina (Van Den Steen et al., 2010). Desta maneira, a maior sobrevivência do animal permite o estudo dos mecanismos associados à SDRA-MA e possíveis terapias contra a patologia pulmonar por um maior período de tempo.

A infecção causada por *P. berghei* ANKA é caracterizada pelo sequestro de eritrócitos parasitados no endotélio vascular, o que induz a hiperativação do sistema imunológico, acarretando um intenso recrutamento de leucócitos, sendo, por isso, o modelo mais utilizado para estudos de malária grave, principalmente, malária cerebral. Já as infecções por *P. berghei* NK65 não são capazes de gerar malária cerebral, as hemácias infectadas não são sequestradas na microvasculatura devido à incapacidade intrínseca do parasito de se aderir ao endotélio ativado, embora ocorra recrutamento de leucócitos e inflamação, mesmo que de forma menos abundante (Baptista et al., 2010).

Recentemente, nós demonstramos que a suplementação com 3g/Kg e 6g/Kg de ômega-3 rico em DHA foi capaz de proteger camundongos C57BL/6 contra danos teciduais pulmonares induzidos pela infecção experimental com *P. berghei* ANKA (não havendo diferença entre as doses) (David-Vieira et al., 2024). No entanto, uma questão não esclarecida é se os efeitos protetores observados podem ser extrapolados para outras cepas de *Plasmodium*. Assim, o presente estudo propõe avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe rico em DHA na proteção contra danos pulmonares decorrentes da infecção experimental induzida por *P. berghei* NK65, uma vez que são cepas com características biológicas distintas.

## 2. JUSTIFICATIVA

A infecção malárica pode desencadear a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) e Lesão Pulmonar Aguda (LPA), agravos que afetam entre 5% e 25% dos adultos infectados. E embora haja tratamento para a infecção, não há uma terapia reconhecidamente eficiente para tais agravos. Contudo, nos últimos anos o ácido docosahexaenoico (DHA) tem sido foco de estudos acerca de diversas doenças pulmonares, como fibrose cística, câncer, COVID-19, dentre outras, devido ao seu reconhecido potencial anti-inflamatório.

Além do pulmão, estudos têm demonstrado que o trato intestinal também pode ser afetado pela infecção, causando dor abdominal, náuseas, diarreia, além de aumento da permeabilidade intestinal, alterações patológicas e na composição da microbiota.

Já é bem estabelecido que as manifestações decorrentes da infecção malárica são causadas, dentre outros fatores, pela hiperativação do sistema imunológico, o que resulta em uma intensa resposta inflamatória, acarretando lesões ou disfunções em diversos órgãos. Deste modo, terapias que visam reduzir a inflamação e minimizar os danos causados pela doença são de grande importância.

Recentemente, nós demonstramos que a suplementação dietética com óleo de peixe rico em DHA foi capaz de minimizar os danos pulmonares em camundongos infectados com *Pb. ANKA*. No entanto, não foram realizadas análises intestinais. E ainda não é estabelecido se os efeitos verificados na infecção por *Pb. ANKA* podem ser extrapolados para infecções com outras cepas, como *Pb. NK65*, que apresenta características biológicas distintas, resultando em diferenças no curso da infecção.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da suplementação dietética com ômega-3 rico em DHA no desenvolvimento de lesões pulmonares e intestinais em camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* NK65.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar sobrevivência, escore clínico e parasitemia sanguínea, além de peso corporal e índices esplênico e hepático de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *P. berghei* NK65;
- Analisar a permeabilidade vascular, bem como a ocorrência de edema pulmonar e de alterações histopatológicas no pulmão de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *P. berghei* NK65;
- Verificar perfil celular e estresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no lavado broncoalveolar (BAL), além da concentração de proteínas no BAL de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *P. berghei* NK65;
- Determinar o perfil fenotípico de células e a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no homogenato do tecido pulmonar de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *P. berghei* NK65;
- Avaliar alterações hematológicas e o perfil fenotípico de populações celulares no baço de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *P. berghei* NK65;
- Analisar a ocorrência de alterações intestinais em camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *P. berghei* NK65.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Camundongos, suplementação e infecção

Camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, foram obtidos do Centro de Bioterismo Regional da Universidade Federal de Juiz de Fora/UFJF, Minas Gerais, Brasil. Os animais foram mantidos no biotério do Núcleo de Pesquisas em Parasitologia (NUPEP), acondicionados em gaiolas de polipropileno alocadas em estantes ventiladas com regulação da temperatura e incidência de luz (12h claro/12h escuro) com água filtrada e ração (Nuvital) *ad libitum*, além de monitoramento veterinário diário para verificação das condições de bem-estar.

Os animais foram suplementados com óleo de peixe rico em DHA (Essential Nutrition). Cada animal recebeu, diariamente, via oral (gavagem), a dose de 3 g DHA/Kg de peso corporal conforme descrito previamente (David-Vieira et al., 2024). Após 15 dias do início da suplementação enteral, os animais foram infectados com  $10^5$  hemácias infectadas (iRBCs) com PbN, via intraperitoneal (i.p.).

### 4.2 Avaliação clínica, sobrevida, parasitemia e análise hematológica

Após a infecção experimental, foi realizado inicialmente o seguimento dos animais para determinação do desfecho clínico (escore, sobrevida e evolução da parasitemia) da infecção dos animais suplementados ou não com óleo. A avaliação clínica diária foi iniciada no 4º dpi e mantida até o momento do óbito utilizando-se o protocolo descrito por Vandermosten e colaboradores, 2018 (Vandermosten et al., 2018). Parâmetros como atividade espontânea (SA), apreensão de membros (LG), tônus corporal (BT), curvatura do tronco (TC), piloereção (PE), tremores (Sh), respiração anormal (AB), desidratação (D), incontinência (I) e paralisia (P) foram avaliados diariamente para determinação do clinical disease severity score. Tais parâmetros foram pontuados com 0 (ausente) ou 1 (presente) para TC, PE, Sh, AB e 0 (normal), 1 (intermediário) ou 2 (grave) para os outros. A pontuação clínica total foi calculada pela fórmula:  $SA + LG + BT + TC + PE + Sh + AB + 3 * (D + I + P)$ . Os

óbitos verificados ao longo do seguimento foram anotados e utilizados na confecção da curva de sobrevida.

Para avaliação da parasitemia sanguínea, iniciada no 4º dpi, foi realizada uma incisão na ponta da cauda para a obtenção de uma gota de sangue/camundongo, a qual foi distendida sobre a lâmina e corada com Giemsa. A seguir, os esfregaços foram analisados em microscópio óptico (aumento de 1000x) para determinação da taxa de parasitos circulantes (David-Vieira et al., 2024).

Para as análises hematológicas (leucócitos totais, eritrócitos, plaquetas, hematócrito e hemoglobina), 500 µL de sangue de cada animal foram armazenados em tubos de coleta contendo EDTA (Labor Import). As análises foram realizadas automaticamente em aparelho HEMIX 5-60.

#### **4.3 Índices esplênico e hepático e Testes bioquímicos (TGO e TGP)**

Para análise dos índices esplênico e hepático, após a eutanásia, os órgãos (baço e fígado) foram coletados, lavados em PBS, secos em papel toalha e pesados em balança analítica (Bioscale) e, em seguida, o valor do índice foi obtido a partir da divisão do peso do órgão pelo peso corporal do animal.

Para avaliar a função hepática, 50 µL de soro coletado no 11º dpi foram utilizados para determinar os níveis de TGO (aspartato aminotransferase - AST) e TGP (alanina aminotransferase - ALT), por kits comerciais. Os protocolos foram realizados conforme recomendação do fabricante (Bioclin).

#### **4.4 Análise da integridade vascular alveolar**

A técnica de coloração com Azul de Evans foi utilizada para avaliar a integridade vascular pulmonar, uma vez que o corante se liga à albumina sérica como veículo para circulação na corrente sanguínea, atravessando o endotélio vascular apenas em caso de injúria. O protocolo utilizado foi aquele descrito previamente por nosso grupo (David-Vieira et al., 2024). No 11º dpi, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório (Syntech), recebendo a seguir, via plexo orbital, 200 µL do corante Azul de Evans a 2% (Sigma-Aldrich). Após 45 minutos, procedeu-se à eutanásia, seguida de perfusão cardíaca com 10 mL de

PBS 1X. Então, os pulmões foram obtidos e mergulhados em 2 mL de uma solução de formamida 10% (Sigma-Aldrich) para recuperação do corante extravasado. Após 48 h de incubação a 37 °C, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm (Varioskan; ThermoFisher). A concentração do corante extravasado foi determinada a partir de uma curva-padrão de diluição seriada, partindo da concentração de 50 µg/mL.

A ocorrência de edema pulmonar foi determinada conforme descrito previamente (Vandermosten et al., 2018). Para tal, após eutanásia, os pulmões não perfundidos foram retirados da caixa torácica, lavados com PBS 1X, secos em papel toalha e pesados em balança analítica (Bioscale).

#### **4.5 Lavagem Broncoalveolar (LBA) para avaliação do perfil celular, concentração de proteínas e estresse oxidativo**

Após eutanásia, a traqueia dos camundongos foram expostas e canuladas com um catéter estéril, seguindo-se a instilação e aspiração de 1 mL de PBS 1X para os pulmões. O aspirado (cerca de 0,8 mL) foi centrifugado a 700 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -80 °C e, então, utilizado para a determinação da concentração de proteínas utilizando-se o BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) (Vieira-Santos et al., 2024). A seguir, o número total de células do sedimento foi determinado por meio de contagem em câmara de Neubauer. Para contagem diferencial (macrófagos, linfócitos e neutrófilos) lâminas contendo 4 x 10<sup>4</sup> células/mL foram confeccionadas usando a centrífuga Cytospin (Cytospin, Thermo Fisher). Após coloração com panótico (Laborclin), realizou-se a contagem diferencial das células (macrófagos, linfócitos e neutrófilos) utilizando microscopia óptica.

O estresse oxidativo foi analisado por meio da liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) pelas células do BAL. Para tal, 2 x 10<sup>5</sup> células/mL foram ressuspendidas em 1 mL de solução de vermelho de fenol (PBS 10X; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho de fenol (Sigma-Aldrich); 8,5 u/mL de HRP tipo II (Sigma- Aldrich). Em seguida, 100 µL de suspensão celular foram plaqueados em triplicata em placas de 96 poços e incubadas por 1 hora a 37° C. Como controle positivo utilizou-se PMA (Forbol Miristato Acetato - 1µg/mL, Sigma Aldrich), agente

capaz de induzir a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas células inflamatórias. A reação foi interrompida com a adição de 10 µL de NaOH, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Agilent BioTek Epoch) a 620 nm. A conversão da absorbância para µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi feita por meio da comparação com a curva padrão com concentrações conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5-40 µM) (David-Vieira et al., 2024). Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.6 Histopatologia**

Para a análise histopatológica, após eutanásia seguida de perfusão cardíaca, o pulmão direito e o intestino dos camundongos foram conservados em formaldeído 4%. As amostras foram clivadas, sendo, o intestino seccionado com base nos diferentes sítios anatômicos (Intestino Delgado e Intestino Grosso). Em seguida, o material foi desidratado em série gradativa de álcool etílico (70, 80, 90 e 95%), por 20 minutos cada e incluídos em parafina. Após inclusão em parafina, os órgãos foram seccionados em micrótomo em cortes de espessura de 3-4 µm, os quais foram dispostos em lâminas de vidro, seguindo-se coloração pela técnica de hematoxilina-eosina. Posteriormente, o material foi analisado e fotografado em microscópio óptico (objetiva 40X) equipado com câmera (Olympus BX53). As imagens foram, então, analisadas por patologistas experientes.

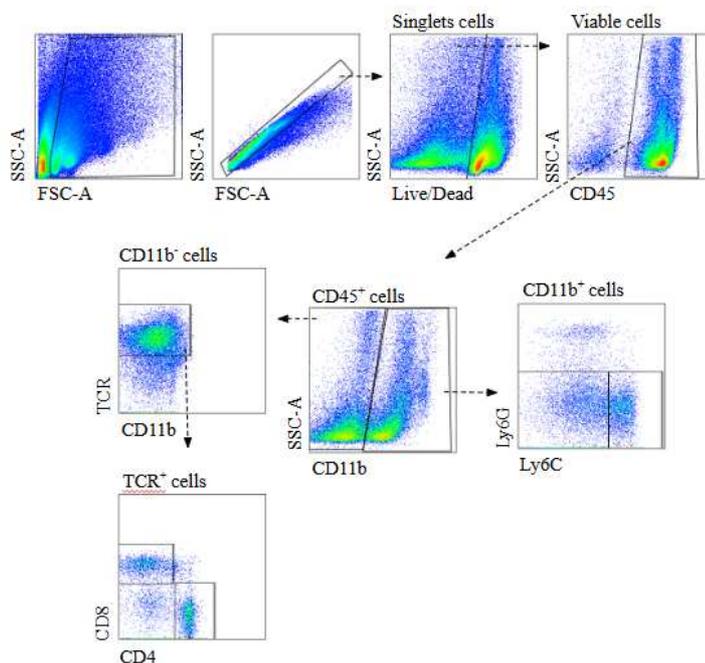
#### **4.7 Isolamento e fenotipagem das células pulmonares**

Para o estudo das populações pulmonares, o órgão de cada animal foi coletado, lavado com PBS 1X e cortado em pedaços de aproximadamente 1 mm com tesoura estéril, seguindo-se incubação com 1 mL de solução de digestão (RPMI sem SFB, 0,5 mg/mL Dnase e 1 mg/mL Colagenase) a 37°C por 30 minutos. Após esse processo, 500 µL de meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) foi utilizado para interromper a digestão do tecido. Então, o tecido foi macerado em cellstrainer (70 µm, BD Biosciences). As suspensões celulares foram centrifugadas a 500 g por 10 minutos a 4 °C e o sedimento foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 completo (5% SFB) para posterior marcação.

Para a fenotipagem, a suspensão celular foi transferida para placas de 96 poços (fundo em V) e centrifugada a 300 g por 10 min, a 10 °C. Posteriormente os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em 50 µL de marcador de viabilidade celular (LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, Invitrogen) com as diluições de acordo com as recomendações do fabricante e incubadas por 30 min, a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X acrescido de 5% de SFB e, novamente centrifugadas, a 500g por 10 min, a 4°C, logo depois foram incubadas por 30 min, a 4°C com 50 µL de tampão FACS contendo os anticorpos: antimouse TCR PE (H57–597, BD Pharmingen), antimouse CD45 FITC (30F11, BD Pharmingen), antimouse CD11b PerCP-Cy5.5 (M1/70, BD Pharmingen), antimouse CD4 APC-H7 (GH1.5, BD Pharmingen) ou antimouse CD8 AF700 (53-6.7; BD Pharmingen). Posteriormente, os anticorpos não ligados foram removidos através de lavagem e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS e analisadas por citometria de fluxo.

Controles de fluorescência FMO (Fluorescence Minus One) foram utilizados para estabelecer os gates da análise. No gate (Figura 7), a região foi definida com base nos perfis de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC). As células mortas foram removidas utilizando a marcação live/dead, e as células únicas foram identificadas em um gráfico de dispersão FSC-H versus FSC-A, garantindo a exclusão de agregados celulares. Em seguida, as populações celulares de interesse foram definidas conforme descrito: leucócitos totais: CD45<sup>+</sup>; células mieloides: CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>; linfócitos T totais: CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup>/TCR<sup>+</sup>; linfócitos T CD4: CD11b<sup>-</sup>/TCR<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>; linfócitos T CD8: CD11b<sup>-</sup>/TCR<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>; monócitos inflamatórios: CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>hi</sup>/Ly6<sup>-</sup>. Foram adquiridos cerca de 300.000 eventos por amostra em citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman Coulter), sendo os dados analisados por meio do software FlowJo (versão 10.0).

## Estratégia de Gate: Pulmão



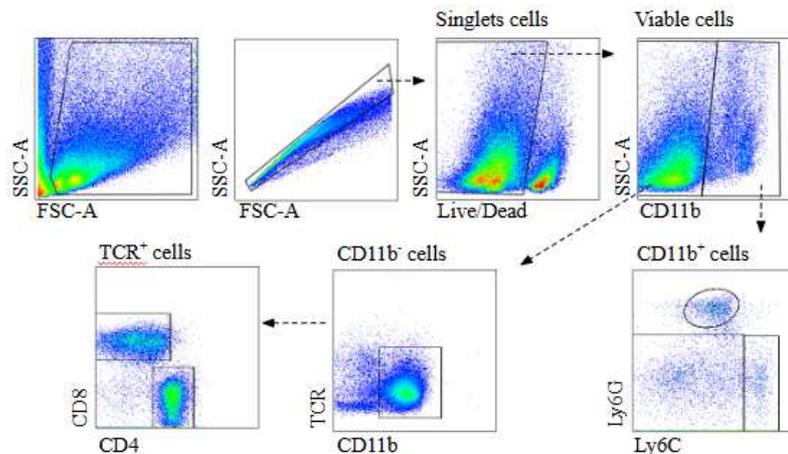
**Figura 7: Estratégia de gate utilizada para imunofenotipagem das células no pulmão de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.** CD45<sup>+</sup>: leucócitos totais; CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>: células mieloides; CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>hi</sup>/Ly6<sup>-</sup>: monócitos inflamatórios; CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup>/TCR<sup>+</sup>: linfócitos T totais; CD11b<sup>-</sup>/TCR<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>: linfócitos T CD4<sup>+</sup>; CD11b<sup>-</sup>/TCR<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>: linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

### 4.8 Isolamento e Fenotipagem das células esplênicas

Considerando que o baço constitui um órgão linfóide central na resposta imune frente a patógenos, procedeu-se à caracterização fenotípica dos grupos experimentais suplementados ou não com o óleo, com o objetivo de identificar possíveis modificações no perfil imunológico. Para tal, o baço foi coletado, pesado, lavado com PBS 1X e colocado em placa de Petri contendo meio RPMI 1640 com 10% SFB (Sigma-Aldrich). Para a obtenção das células, o órgão foi macerado em cellstrainer (70  $\mu$ m, BD Biosciences) com 5 mL de meio RPMI com 10% de SFB, utilizando o êmbolo de seringa. As suspensões celulares foram centrifugadas a 400 g, por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi

ressuspendido em 5 mL em tampão de hemólise ACK (0,15 M de cloreto de amônio, 0,01 M de bicarbonato de potássio, 0,012 mM de EDTA). Após 10 minutos em temperatura ambiente, o ACK foi neutralizado com 10 mL de meio RPMI com 10 % de SFB e a suspensão foi centrifugada a 400 g por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em 5 mL de RPMI com 10% SFB. As células viáveis foram contadas utilizando Azul de Tripán e a concentração celular foi ajustada para  $10^6$  células vivas/poço em placas de 96 poços (fundo em V). Em seguida, as placas foram centrifugadas a 500 g, por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 50 µL de marcador de viabilidade celular (LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, Invitrogen) com as diluições de acordo com as recomendações do fabricante e incubadas por 30 min, a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1X acrescido de 5% de SFB e, novamente centrifugadas, a 500g por 10 min, a 4°C, logo depois foram incubadas por 30 min, a 4°C com 50 µL de tampão FACS contendo os anticorpos: antimouse CD11b PerCP-Cy5.5 (M1/70, BD Pharmingen); antimouse Ly6C PE-Cy7 (AL-21, BD Pharmingen); antimouse Ly6G APC (1A8; BD Pharmingen); antimouse CD4 APC-H7 (GH1.5, BD Pharmingen) ou antimouse CD8 AF700 (53-6.7; BD Pharmingen). Após incubação, os anticorpos não ligados foram removidos através de lavagem e as células foram ressuspendidas em 200 µL de PBS e analisadas por citometria de fluxo. A aquisição das amostras foi feita em citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman Coulter), sendo os dados analisados por meio do software FlowJo (versão 10.0). No gate (Figura 8), as populações celulares foram definidas conforme descrito: células mieloides: CD11b<sup>+</sup>; monócitos inflamatórios: CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>hi</sup>/Ly6<sup>-</sup>; linfócitos T totais: CD11b<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup>; linfócitos T CD4: CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>; linfócitos T CD8: CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

## Estratégia de Gate: Baço



**Figura 8: Estratégia de gate utilizada para imunofenotipagem das células no baço de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.** Estratégia de gate utilizada para as células no baço: CD11b<sup>+</sup>: células mieloides; CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>hi</sup>/Ly6<sup>-</sup>: monócitos inflamatórios; CD11b<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup>: linfócitos T totais; CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>: linfócitos T CD4<sup>+</sup>; CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>: linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

## 4.9 Dosagem de Citocinas

Após a eutanásia, o pulmão esquerdo de cada animal foi armazenado em microtubos e mantidos a -80°C até o processamento para obtenção de homogenato tecidual. Para tal, o tecido pulmonar foi macerado em solução de extração (0,4 M NaCl, 0,05% Tween-20, 0,5% BSA-albumina de soro bovino, 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA, 0,02% de aprotinina), sendo utilizados 1000 µL de solução de extração/100 mg de tecido. Após esse processo, a suspensão obtida foi centrifugada a 500 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado, aliquoteado e armazenado a -80°C. Os níveis das citocinas IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ foram quantificados utilizando kits OptEIA, seguindo-se as recomendações do fabricante (BD Biosciences). Os valores das absorbâncias foram obtidos por espectrofotometria a 450 nm e a concentração de

citocinas presentes em cada amostra foi determinada a partir da equação de regressão linear obtida pelos valores das absorvâncias referentes à curva padrão de cada citocina.

#### **4.10 Análise de alterações patológicas no intestino**

Para avaliação da ocorrência de alterações patológicas intestinais, no 11<sup>o</sup> d.p.i., os camundongos foram deixados em jejum por 4 horas. Em seguida, foram gavados com 200 µL de FITC-dextran (0,6 mg/g body weight) (fluoresceína isotiocianato–dextrana; 4000 kDa; Sigma-Aldrich). Após mais 4 horas, em ambiente protegido de luz, os animais foram eutanasiados após anestesia (100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine), procedendo-se à coleta de sangue por punção cardíaca, seguida de perfusão cardíaca e coleta do intestino. Para a determinação da permeabilidade intestinal, o sangue foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos a 4 °C para obtenção do plasma. A concentração do FITC plasmático foi obtida após realização de leitura em fluorímetro de placa (Varioskan; Thermo Fisher; 488 nm excitation/530 nm emission) e comparação com curva-padrão (Taniguchi et al., 2015). A permeabilidade intestinal também foi analisada por meio da técnica de coloração com Azul de Evans, conforme descrito anteriormente.

Para determinação de alterações macroscópicas induzidas pela infecção, os intestinos de animais de cada grupo foram medidos e fotografados. O órgão, em toda sua extensão, foi conservado em formalina 10% e processado para análise histopatológica conforme descrito anteriormente.

#### **4.11 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism (software GraphPad, versão 8.4.3). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a distribuição das variáveis. Seguindo-se teste T para comparar as médias entre dois grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

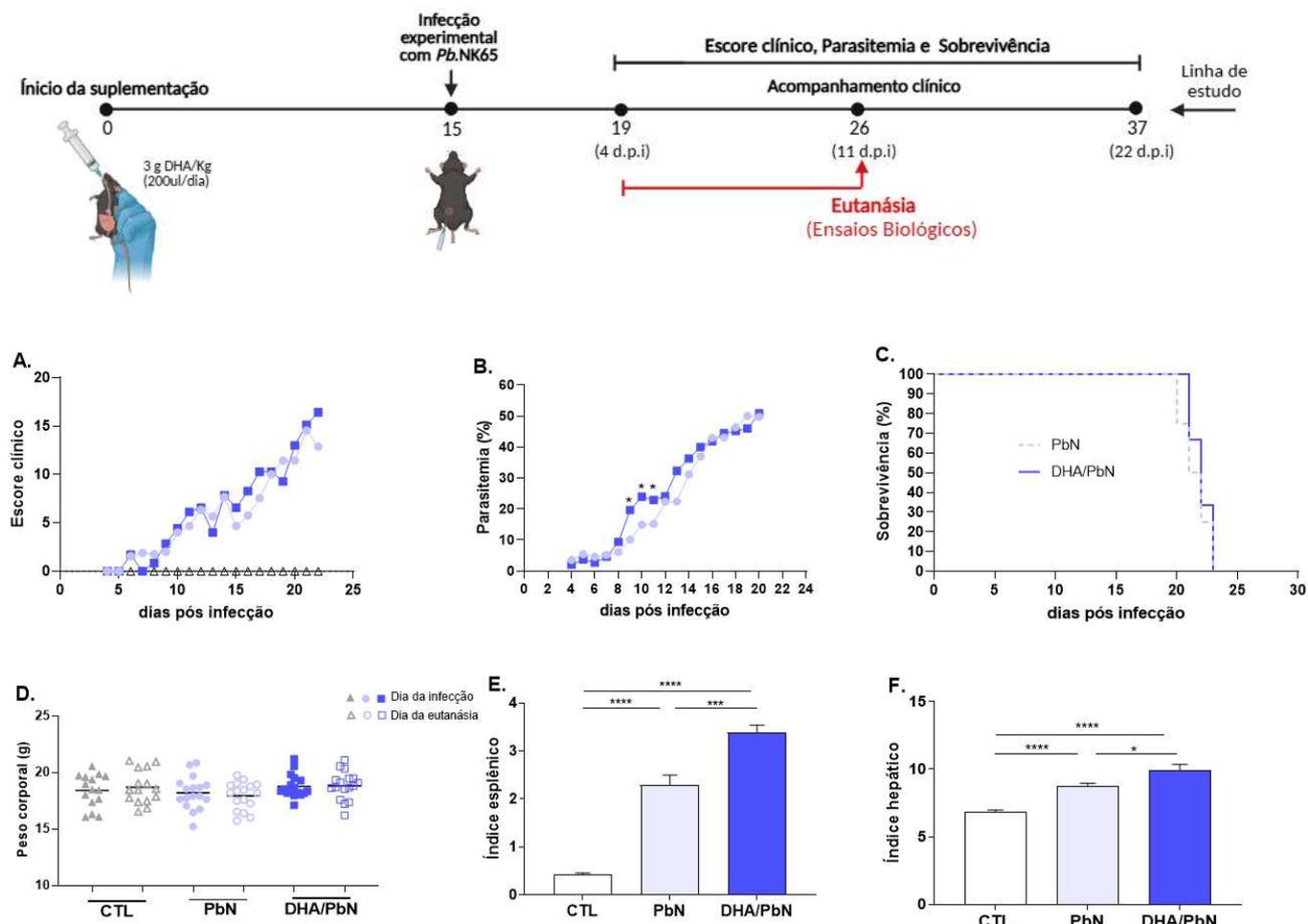
## 5. RESULTADOS

### 5.1 A suplementação dietética com óleo de peixe rico em DHA não altera o desfecho clínico da infecção e se associa a altas taxas de parasitos circulantes

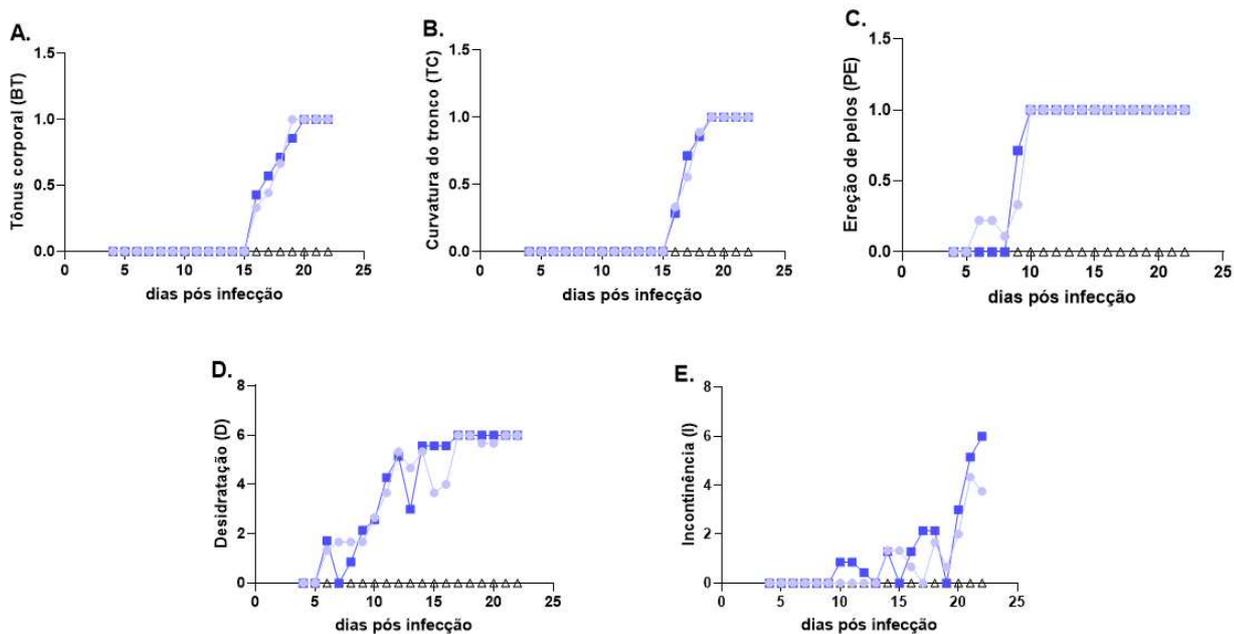
Para determinação do perfil clínico e sobrevida, os animais receberam suplementação dietética com óleo de peixe rico em DHA (3g DHA/kg) durante 15 dias, sendo, então, infectados com PbN. A suplementação foi mantida até a morte espontânea dos animais. Tanto os animais suplementados/infectados (DHA/PbN), quanto aqueles apenas infectados (PbN) apresentaram deterioração clínica progressiva ao longo do seguimento (Figura 9A) sendo a desidratação, ereção de pêlos, incontinência urinária, curvatura do corpo e perda de tônus muscular os principais sinais (Figura 10). Como pode ser observado, a desidratação e a piloereção foram os primeiros sinais observados, atingindo o valor máximo de escore por volta do 14º e 9º d.p.i., respectivamente, em ambos os grupos. Por outro lado, o grau máximo de incontinência somente foi observado nos últimos dias da infecção. De maneira geral, a deterioração clínica foi acompanhada pela elevação da parasitemia sistêmica, a qual esteve particularmente aumentada no grupo DHA/PbN em relação ao grupo PbN somente nos dias 9, 10 e 11 d.p.i.. No 22º d.p.i a taxa de parasitemia circulante em ambos os grupos atingiu pico superior a 50%, caracterizando o quadro típico de hiperparasitemia (Figura 9B); nesse ponto do segmento 100% dos animais sucumbiram para o óbito (Figura 9C).

Visto que, a partir do 12º d.p.i., as taxas de parasitos circulantes foram similares entre os grupos PbN e DHA/PbN, o dia 11 d.p.i foi escolhido a realização da eutanásia e coleta dos órgãos para os experimentos adicionais. Como ilustrado na figura 9 (D), a suplementação com óleo não alterou o peso dos animais em relação àqueles que não receberam a suplementação. Por outro lado, animais pertencentes ao grupo DHA/PbN apresentaram índice esplênico e hepático significativamente aumentado em relação aos animais controle e PbN (Figura 9 E e

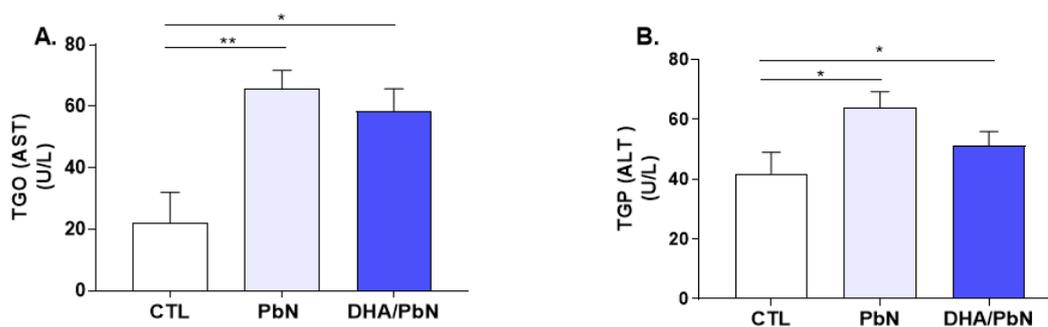
F). As dosagens de TGO e TGP também estiveram significativamente elevadas nos animais infectados, independentemente se suplementados ou não (Figura 11).



**Figura 9: Avaliação das condições clínicas, parasitemia sistêmica, sobrevivência, peso corporal, índices esplênico e hepático de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.** (A) Avaliação clínica dos animais ao longo da infecção; (B) Parasitemia sanguínea a partir do 4° ao 22° dpi; (C) Curva de sobrevivência dos animais suplementados e infectados e apenas infectados; (D) Peso corporal dos animais no dia da infecção e no dia da eutanásia (11° d.p.i.); (E) Índice esplênico (11° d.p.i); (F) Índice hepático (11° d.p.i). Os resultados são mostrados como frequência ou média  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferença estatística: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . CTL: camundongos não suplementados e não infectados (triângulo); PbN: camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65 (círculo); DHA/PbN: camundongos suplementados com 3 g/Kg de DHA e infectados com *Pb. NK65* (quadrado).



**Figura 10: Avaliação de parâmetros clínicos de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.** (A) Tonus corporal (BT); (B) Curvatura do tronco (TC); (C) Ereção de pêlos (PE); (D) Desidratação (D); (E) Incontinência (I). Os resultados são mostrados como frequência ou média  $\pm$  SEM. CTL: camundongos não suplementados e não infectados (triângulo); PbN: camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65 (círculo); DHA/PbN: camundongos suplementados com 3g/Kg de DHA e infectados com *Pb. NK65* (quadrado).



**Figura 11: Análise das taxas de TGO e TGP no soro de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.** (A) TGO (AST - Aspartato Aminotransferase; (B) TGP (ALT - Alanina Aminotransferase). Os resultados são

mostrados como frequência ou média  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferença estatística: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . CTL: camundongos não suplementados e não infectados; PbN: camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65; DHA/PbN: camundongos suplementados com 3g/Kg de DHA e infectados com *Pb. NK65*.

## **5.2 A suplementação dietética com óleo de peixe rico em DHA não mitiga as alterações hematológicas e pulmonares causadas pela infecção por PbN em camundongos C57BL/6**

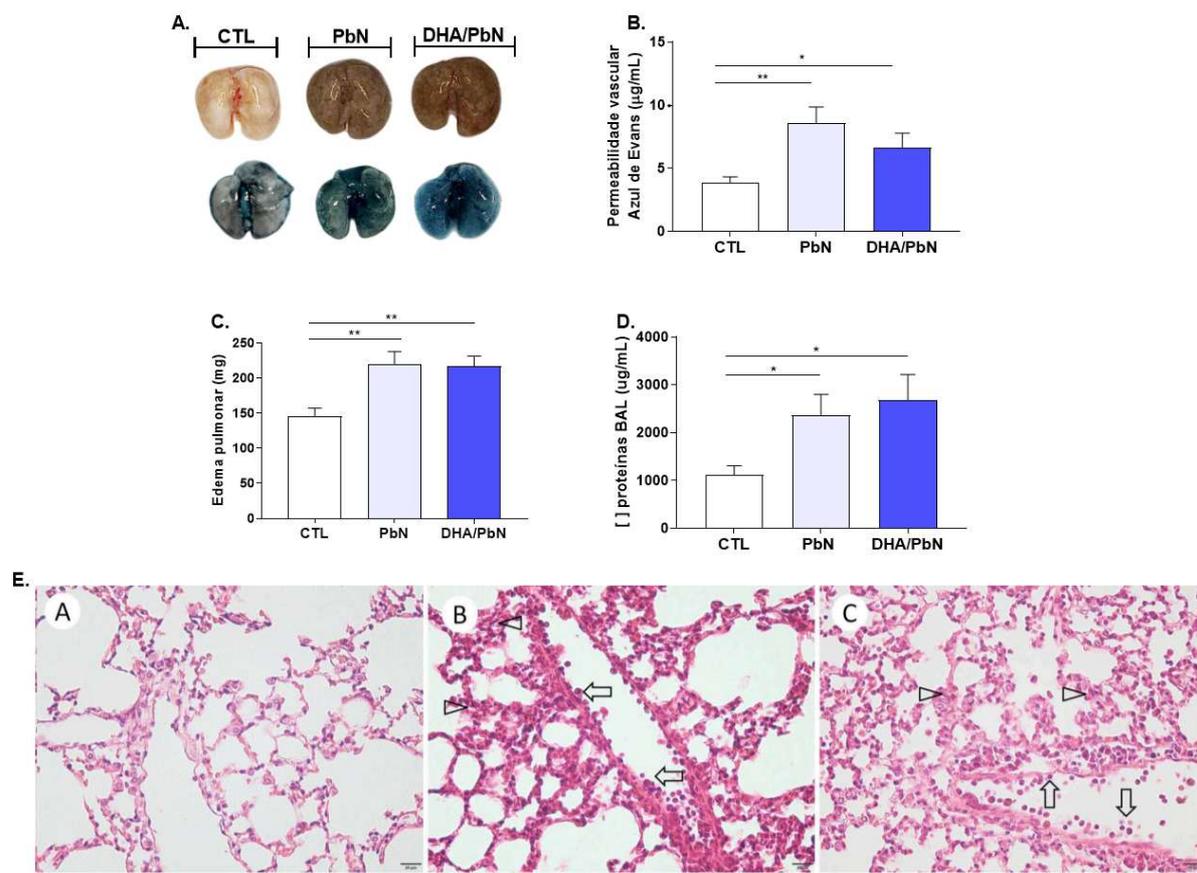
Considerando estudos prévios realizados com a mesma linhagem de camundongos infectados com PbN (Vandermosten et al., 2018; Vieira-Santos et al., 2024), bem como a diferença nos níveis de parasitos circulantes entre os dias 9 e 11 d.p.i. observada entre grupos experimentais infectados, para todas as análises a seguir os animais foram eutanasiados no 11º d.p.i.. Nesse dia, o principal sinal clínico observado nos grupos PbN e DHA/PbN foi a desidratação (score médio = 4) e a piloereção (score médio = 1). Nesses grupos, houve aumento significativo no número de leucócitos circulantes em relação ao observado nos animais controle. Por outro lado, a contagem de eritrócitos e plaquetas, bem como níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e hematócrito (%) estiveram significativamente reduzidos tanto no grupo PbN quanto no DHA/PbN em relação ao controle (Tabela 1).

**Tabela 1: Análises hematológicas de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.**

Parâmetros	Grupos			Valor de p
	CTL	PbN	DHA/PbN	
Leucócitos Totais (10 <sup>3</sup> /μL)	4,72 (±1,53)	6,54 (±2,23)	7,80 (±2,78)	0,0046
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> /μL)	8,41 (±0,68)	5,61 (±0,89)	4,93 (±1,29)	< 0,0001
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	502,36 (±117,25)	95,7 (±18,56)	92,0 (±23,77)	< 0,0001
Hematócrito (%)	42,95 (±3,65)	29,81 (±3,89)	29,70 (±5,10)	< 0,0001
Hemoglobina (g/dL)	12,80 (±1,0)	7,99 (±1,23)	6,90 (±1,91)	< 0,0001

Resultados, representativos de 2 experimentos independentes (n=5-6 camundongos/grupo), são mostrados como média ± SEM. CTL: camundongos não suplementados e não infectados; PbN: camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65; DHA/PbN: camundongos suplementados com 3g/Kg de DHA e infectados com *Pb. NK65*.

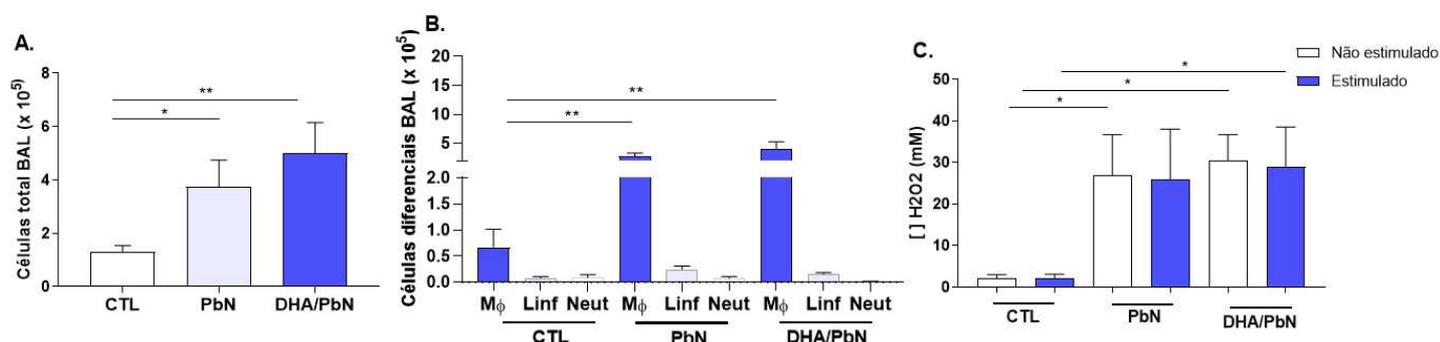
A seguir, investigou-se a ocorrência de alterações pulmonares, tais como permeabilidade vascular e edema (em pulmões de animais não perfundidos), induzidas por PbN. Conforme observado, animais do grupo PbN e DHA/PbN apresentaram aumento significativo da permeabilidade vascular alveolar (Figura 12 A e B) em relação aos animais controle, corroborando a presença de edema pulmonar (Figura 12C) em ambos os grupos. No mesmo sentido, a concentração de proteínas no BAL esteve significativamente aumentada nos grupos infectados, PbN e DHA/PbN, quando comparado com animais controle (Figura 12D). Em ambos os grupos, a análise histopatológica evidenciou inflamação discreta a moderada com marginação leucocitária intravascular (seta) e discreto espessamento dos septos interalveolares (cabeça de seta) (Figura 12E).



**Figura 12: Avaliação da permeabilidade vascular, edema pulmonar, concentração de proteínas e histologia do tecido pulmonar de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.** (A) Pulmão dos animais controle, animais apenas infectados e animais suplementados e infectados; (B) Concentração de corante azul de Evans extravasado (µg/mL); (C) Peso do pulmão (mg); (D) Concentração total de proteínas no sobrenadante do BAL (µg/mL). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes (n=5-6 camundongos/grupo) e são mostrados como média ± SEM. (\*) Indica diferença estatística: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01. CTL: camundongos não suplementados e não infectados; PbN: camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65 (círculo); DHA/PbN: camundongos suplementados com 3g/Kg de DHA e infectados com *Pb. NK65* (quadrado). (E) Fotomicrografias do tecido pulmonar: (A) CTL - grupo controle não infectado, (B) PbN - animais apenas infectados, (C) DHA/PbN - animais suplementados e infectados. Inflamação discreta a moderada, marginação leucocitária intravascular (seta), espessamento dos septos interalveolares (cabeça de seta). Barra de calibração de 20 micrômetros.

### 5.3 A suplementação dietética com óleo de peixe rico em DHA não previne a infiltração de células inflamatórias e a ocorrência de estresse oxidativo nos pulmões de camundongos C57BL/6 infectados com PbN

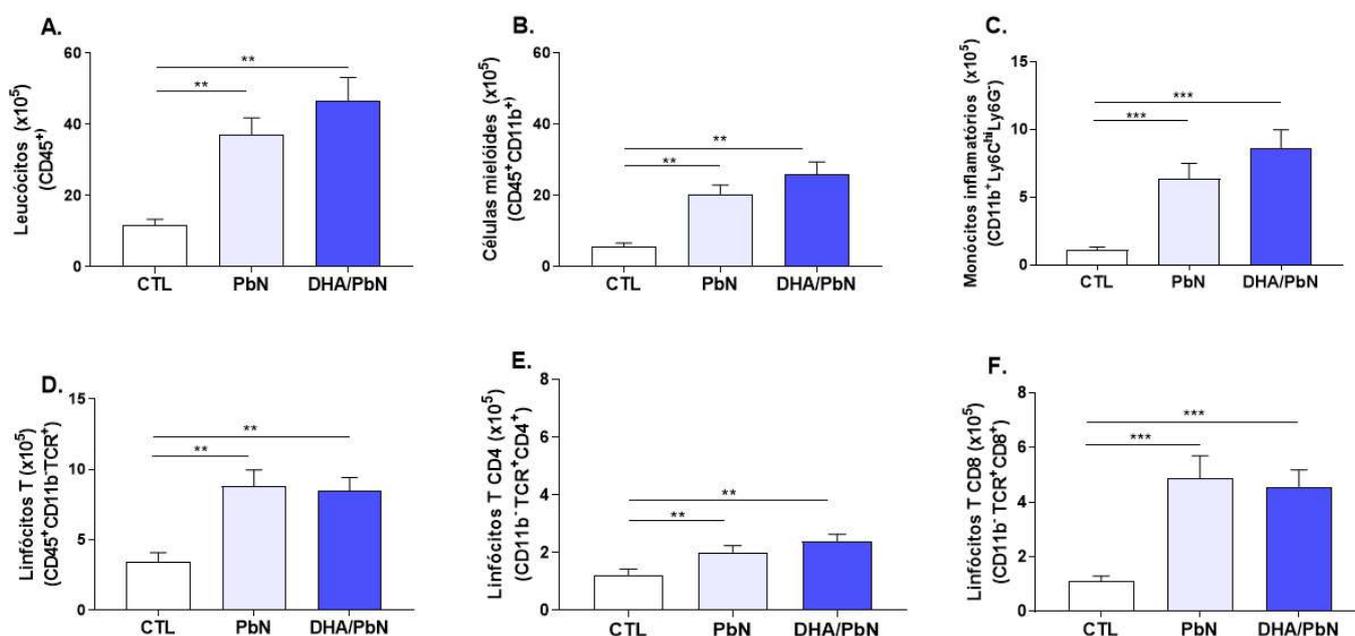
A patologia pulmonar induzida pela infecção experimental com PbN também foi investigada por meio da coleta e análise do BAL obtido no 11º dpi (Figura 13). Inicialmente foi determinado o número total de células, sendo esse significativamente maior em animais infectados, em relação ao grupo controle, independentemente da suplementação com óleo de peixe (Figura 13A). Dentre os tipos celulares infiltrados nos pulmões, os macrófagos foram predominantes (Figura 13B). Finalmente, a influência do estresse oxidativo nos danos pulmonares pode ser sugerida com base nos níveis de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produzido pelas células obtidas do BAL (Figura 13C). Nesse caso, não houve diferença entre os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzidos por células provenientes dos animais infectados.



**Figura 13: Avaliação do infiltrado inflamatório e liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no lavado broncoalveolar de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.** (A) Concentração total de células no BAL (nº céls x 10<sup>5</sup>); (B) Contagem diferencial das populações celulares no BAL (nº céls x 10<sup>5</sup>); (C) Concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzida pelas células inflamatórias presentes no BAL (mM). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes (n= 5-6 camundongos/grupo) e são mostrados como média  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferença estatística: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01. CTL: camundongos não suplementados e não infectados; PbN: camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65; DHA/PbN: camundongos suplementados com 3g/Kg de DHA e infectados com *Pb. NK65*.

## 5.4 A suplementação dietética com óleo de peixe rico em DHA não modifica perfil fenotípico de células pulmonares observado durante a infecção por PbN em camundongos C57BL/6

A seguir, foi investigado o perfil fenotípico de células pulmonares em animais infectados, suplementados ou não com óleo de peixe contendo 3g DHA/kg de peso corporal. Corroborando os achados anatomopatológicos, observa-se que, o número total de células para todos os subtipos analisados (leucócitos, células mieloides, monócitos inflamatórios, linfócitos T, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+), estiveram significativamente aumentados em animais infectados, PbN e DHA/PbN, em relação aos controle. Interessantemente, uma tendência de maior aumento no número de leucócitos totais, células mieloides e monócitos inflamatórios foi observada para animais do grupo DHA/PbN em relação ao grupo PbN (Figura 14 A-F).

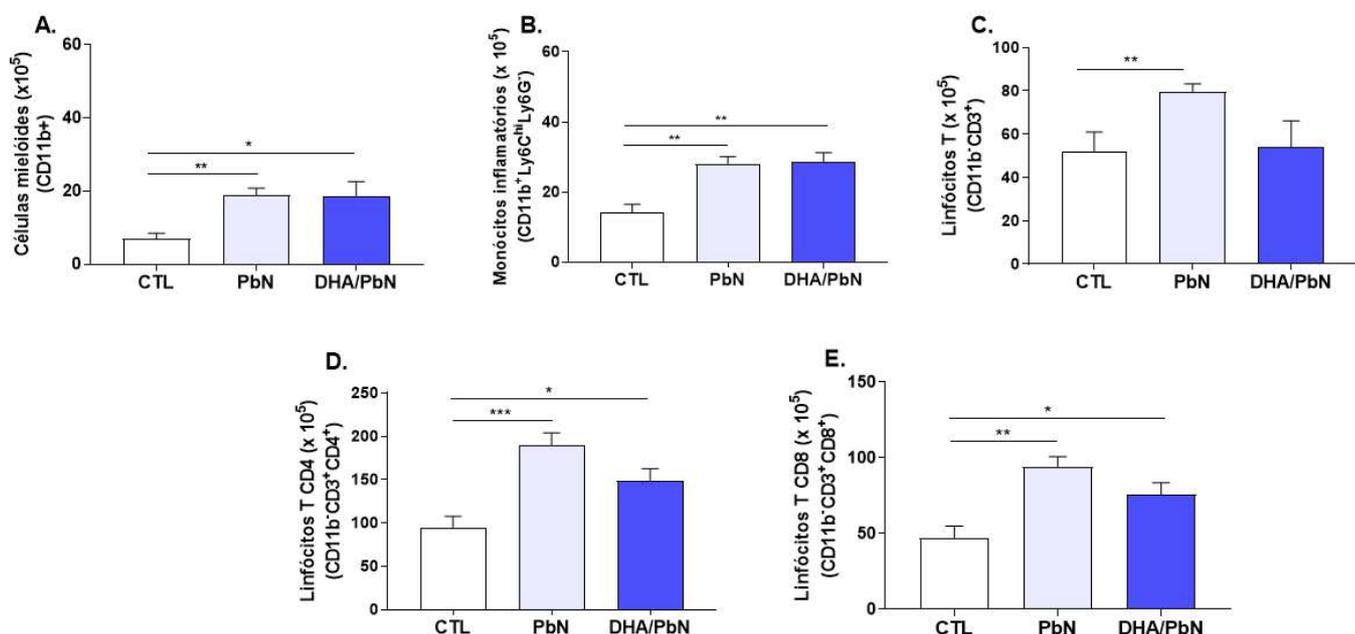


**Figura 14: Perfil fenotípico das populações celulares presentes no tecido pulmonar de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.** (A) Leucócitos totais; (B) Células mieloides; (C) Monócitos inflamatórios; (D) Linfócitos T; (E) Linfócitos T CD4; (F) Linfócitos T CD8. Os gráficos mostram o número médio de células expressando o(s) receptor(es) específico(s) x 10<sup>5</sup> células; n = 5–6 camundongos/grupo. (\*) Indica diferença estatística: \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001. CTL:

camundongos não suplementados e não infectados; PbN: camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65; DHA/PbN: camundongos suplementados com 3g/Kg de DHA e infectados com *Pb. NK65*.

### 5.5 A suplementação dietética com DHA não altera o perfil das populações celulares presentes no baço de camundongos C57BL/6 infectados com PbN

Foi analisado o perfil fenotípico de células presentes no tecido esplênico de animais infectados, suplementados ou não com óleo de peixe rico em DHA. Foi observado que, independente da população celular analisada (células mielóides, monócitos inflamatórios, linfócitos T, linfócitos CD4+ e linfócitos T CD8+), houve significativo aumento no número de células nos animais infectados em relação aos controles. De forma interessante, foi observada uma tendência de redução no número de linfócitos T totais, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ nos animais do grupo DHA/PbN quando comparados aos do grupo PbN (Figura 15 A-E).

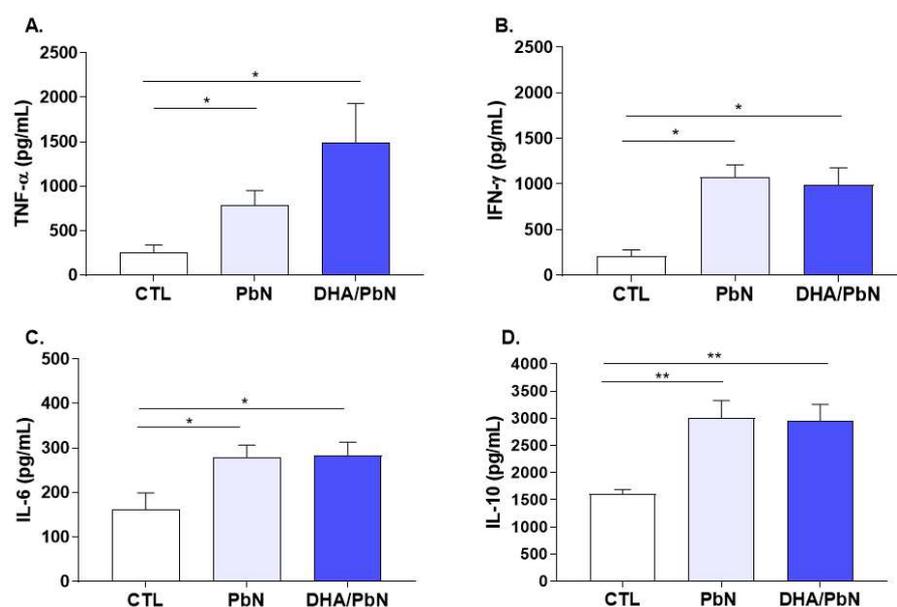


**Figura 15: Imunofenotipagem das populações celulares no baço de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.** (A) Células mielóides; (B) Monócitos inflamatórios; (C) Linfócitos T totais; (D) Linfócitos T CD4; (E) Linfócitos T CD8. Os gráficos mostram o número médio de células expressando o(s)

receptor(es) específico(s)  $\times 10^5$  células;  $n = 5-6$  camundongos/grupo. (\*) Indica diferença estatística: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . CTL: camundongos não suplementados e não infectados; PbN: camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65; DHA/PbN: camundongos suplementados com 3g/Kg de DHA e infectados com *Pb. NK65*.

## 5.6 A suplementação dietética com óleo de peixe rico em DHA não altera o padrão de resposta inflamatória pulmonar induzido pela infecção experimental com PbN.

A dosagem de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no tecido pulmonar foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Observa-se que os níveis das citocinas pró-inflamatórias estiveram significativamente elevados nos animais infectados, PbN e DHA/PbN, quando comparados ao grupo controle (Figura 16 A-C). O mesmo foi observado na citocina anti-inflamatória IL-10, onde as concentrações estiveram significativamente aumentadas nos grupos infectados, independentemente da suplementação (Figura 16D).

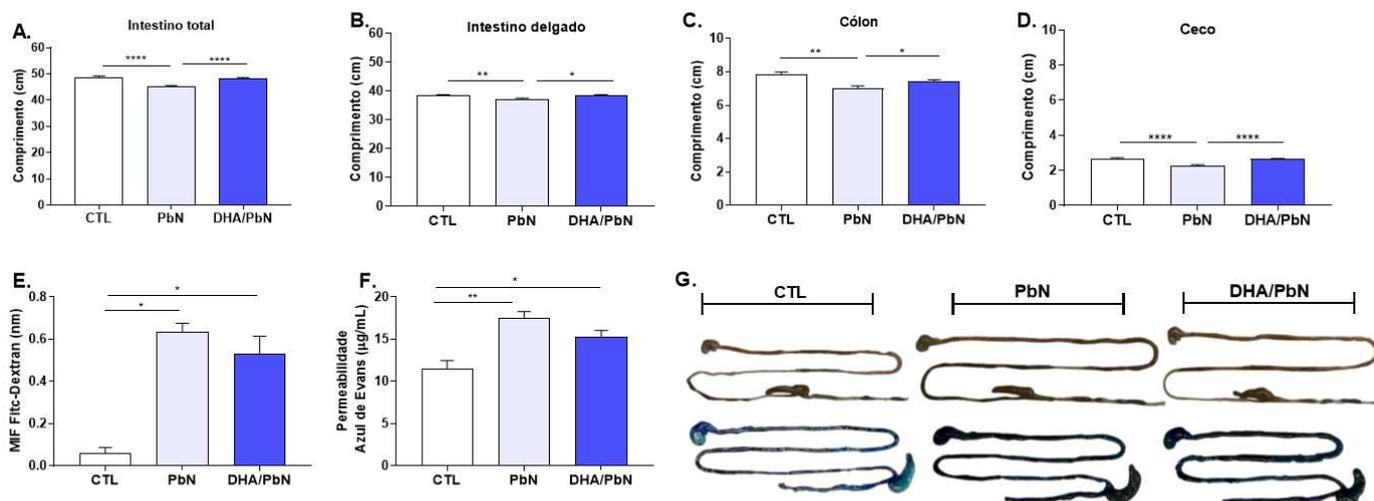


**Figura 16: Dosagem de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no homogenato do tecido pulmonar de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb. NK65*.** (A) Níveis de TNF- $\alpha$  (pg/mL); (B) IFN- $\gamma$  (pg/mL); (C) IL-6 (pg/mL); (D) IL-10 (pg/mL). Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes ( $n = 5-6$  camundongos/grupo) e são mostrados como média  $\pm$

SEM. (\*) Indica diferença estatística: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . CTL: camundongos não suplementados e não infectados; PbN: camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65; DHA/PbN: camundongos suplementados com 3g/Kg de DHA e infectados com *Pb*. NK65.

### 5.7 A suplementação dietética com óleo de peixe rico em DHA impede alterações morfométricas mas não interfere no aumento da permeabilidade intestinal induzida pela infecção com PbN em camundongos C57BL/6

Para investigar o possível impacto da infecção experimental por PbN no trato intestinal (Figura 17), animais pertencentes a cada um dos grupos experimentais foram eutanasiados no 11º dpi. Macroscopicamente, foi observado redução na extensão total do intestino (Figura 17A), intestino delgado (Figura 17B), cólon (Figura 17C) e ceco (Figura 17D) dos animais apenas infectados, quando comparados aos animais do grupo suplementado e controle. No mesmo sentido, no grupo infectado, houve aumento significativo da permeabilidade intestinal (Figura 17 E-G), ao passo que, nos animais suplementados, houve redução, embora não significativa, da permeabilidade quando em comparação ao grupo PbN.



**Figura 17: Avaliação de alterações intestinais de camundongos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *Pb*. NK65.** (A) Comprimento do intestino total (cm); (B) Intestino delgado (cm); (C) Cólon (cm); (D) Ceco (cm); (E) Média de intensidade de fluorescência (nm); (F) Concentração de azul de Evans (µg/mL); (G)

Intestino dos animais controle e animais infectados e suplementados e infectados. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes (n= 5-6 camundongos/grupo) e são mostrados como média ± SEM. (\*) Indica diferença estatística: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*\*p < 0.0001. CTL: camundongos não suplementados e não infectados; PbN: camundongos infectados com *Plasmodium berghei* NK65; DHA/PbN: camundongos suplementados com 3g/Kg de DHA e infectados com *Pb. NK65*.

## 6. DISCUSSÃO

As complicações graves oriundas da infecção malárica, tais como a malária cerebral, a anemia grave e a síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), são determinantes do prognóstico da doença. A ARDS, a qual acomete especialmente adultos, decorre de uma intensa resposta inflamatória no parênquima pulmonar, culminando em aumento da permeabilidade vascular alveolar, edema e, conseqüente, comprometimento das trocas gasosas com possibilidade de evolução para o óbito (20% dos casos) (Van Den Steen et al., 2010). O reconhecimento da relevância dessa complicação é fundamental para orientar pesquisas que busquem compreender seus mecanismos fisiopatológicos e propor alternativas terapêuticas mais eficazes. Recentemente nós demonstramos que camundongos C57BL/6 suplementados com óleo de peixe contendo alta concentração de DHA foram protegidos contra danos pulmonares causados pela infecção malárica experimental por *Pb. ANKA* (David-Vieira et al., 2024). Nesse estudo, porém, nós demonstramos que os resultados obtidos em nosso estudo prévio não podem ser extrapolados para outras cepas de parasitos também capazes de induzir lesões pulmonares.

Neste trabalho observamos que os grupos PbN e DHA/PbN apresentaram taxa de mortalidade de 100% entre os dias 20 e 22 de infecção, corroborada pela deterioração clínica progressiva ao longo do seguimento e por uma elevação da parasitemia sistêmica, que, surpreendentemente, foi superior nos animais suplementados entre os dias 9 e 11 d.p.i.. Esses achados contrastam com trabalhos prévios que mostraram que a suplementação com óleo de peixe contendo, ou não, antioxidantes como vitamina E, foi capaz de suprimir a parasitemia em infecções por *P. berghei* (Godfrey et al., 1957) e *P. yoelii* (Levander et al., 1989; Fujikawa et

al., 1993). Contudo, é importante enfatizar que os experimentos conduzidos previamente por outros grupos divergem em estratégia experimental como dose, via utilizada e o tempo de suplementação, o que torna os resultados não estritamente comparáveis. De qualquer forma, utilizando estritamente o mesmo protocolo experimental nosso grupo demonstrou recentemente que a suplementação com ômega 3 rico em DHA foi capaz de controlar a parasitemia circulante em camundongos C57BL/6 infectados com PbA (David-Vieira et al., 2024) e que a suplementação com altas doses de DHA reduziu de 60% a 80% o risco de malária cerebral (Carpinter et al., 2024), assim como protegeu os animais contra danos pulmonares (David-Vieira et al., 2024). Em relação ao peso corporal, nenhuma alteração significativa foi observada nos animais que receberam a suplementação, o que vai de encontro a estudos anteriores, que também não demonstraram relação entre suplementação dietética com óleo de peixe e ganho de peso, tanto em roedores (Hainault et al., 1993; Ruzickova et al., 2004) quanto em humanos (Sánchez-lara et al., 2014; Aredes et al., 2019).

Além do exposto, outras manifestações clínicas comuns nas infecções maláricas incluem alterações hematológicas e aumento de órgãos como baço e fígado (Abdalla, 1988; Engwerda et al., 2005) que geralmente associam-se à intensa resposta inflamatória gerada pelo organismo frente a presença e/ou persistência da parasitemia sanguínea. No presente estudo, animais provenientes dos grupos PbN e DHA/PbN apresentaram significativa hepatoesplenomegalia. Em relação às alterações hematológicas, verificamos que a infecção com PbN acarretou um aumento significativo de leucócitos no sangue periférico dos animais, o que não foi mitigado pela suplementação. Isso sugere que no modelo de infecção utilizado, o DHA em altas concentrações não foi capaz de minimizar a resposta imunológica exacerbada do organismo ao parasito. A redução acentuada no número de eritrócitos e conseqüentemente, no hematócrito e na concentração de hemoglobina no sangue dos animais infectados, suplementados ou não, em relação aos não infectados corrobora estudos anteriores que sugerem uma intensa destruição de hemácias, parasitadas ou não, na infecção malárica (Abdalla, 1988), e que esta destruição está associada a alterações na membrana dessas células e à expressão de proteínas do parasito, que induzem a apoptose. Adicionalmente, a adsorção de antígenos e metabólitos dos parasitos nas hemácias saudáveis

contribuiu de forma significativa para a destruição dessas células pelo baço (Engwerda et al., 2005). Por fim, a produção de hemozoína pelos parasitos, bem como a resposta imune caracterizada por intensa produção de citocinas pró-inflamatórias também contribuem para disfunção medular e consequentemente, anemia (Casals-Pascual et al., 2006).

Ainda nesse contexto, verificamos uma redução expressiva no número de plaquetas circulantes dos grupos infectados, sendo esta queda mais acentuada no grupo suplementado. Já se sabe que a trombocitopenia é uma manifestação hematológica comum na malária, especialmente quando causada por *P. vivax* (Lacerda, 2007). Visto isso, nossos dados corroboram os resultados previamente descritos por De Azevedo-Quintanilha et al., 2020, nos quais animais infectados com *Pb*. NK65 apresentaram plaquetopenia no 9º dia de infecção, possivelmente em função da formação de agregados celulares, como plaquetas-monócitos e plaquetas-neutrófilos (De Azevedo-Quintanilha et al., 2020). Outra hipótese para a plaquetopenia é o sequestro de plaquetas no baço, como resultado da ligação específica de IgG a antígenos maláricos ligados a plaquetas (Grau et al., 1988; Gupta et al., 2013). Nossos dados estão de acordo com esses achados uma vez que demonstramos que no grupo DHA/PbN a parasitemia esteve aumentada de forma significativa em relação ao grupo PbN entre os dias 9 e 11 de infecção.

No que se refere às complicações pulmonares associadas a infecções com PbN, sabe-se que o edema pulmonar, caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular e acúmulo de líquido alveolar, é a manifestação mais comum da doença (De Azevedo-Quintanilha et al., 2020). Em nosso estudo pode ser observado aumento da permeabilidade vascular e, consequente ocorrência de edema pulmonar, assim como uma maior concentração de proteínas no sobrenadante do lavado broncoalveolar nos dois grupos infectados, sugerindo que a suplementação com DHA não foi capaz de atuar contra os mecanismos que desencadeiam tais processos. Esses achados corroboram os estudos prévios que mostraram que camundongos infectados com PbN apresentam aumento da permeabilidade vascular e edema pulmonar a partir do dia 8 d.p.i. (Vieira-Santos et al., 2024; Van Den Steen et al., 2010), além de influxo de células inflamatórias para o tecido, contribuindo para lesões pulmonares (Vieira-Santos et al., 2024). Vandermosten e colaboradores demonstraram que a infecção de camundongos

C57BL/6 com *Pb*. NK65 leva à inflamação pulmonar letal com edema intersticial e alveolar rico em proteínas (Vandermosten et al., 2018). Em processos inflamatórios, os monócitos são uma das primeiras populações celulares a migrarem para o tecido, tendo papel de destaque na patologia da malária, uma vez que se diferenciam em macrófagos e atuam nos processos de fagocitose, apresentação de antígenos e produção de citocinas (Dobbs et al., 2020). Em nosso trabalho, a infecção com PbN promoveu a infiltração de células mononucleares, como monócitos e linfócitos, no lavado broncoalveolar dos camundongos infectados. Esses dados são corroborados por um estudo que mostrou intenso acúmulo de leucócitos no pulmão e no lavado broncoalveolar dos animais nos dias 8 e 10 d.p.i com PbN, com predominância de células mononucleares, enquanto não houve alteração significativa no número de células polimorfonucleares quando comparados aos animais não infectados (De Azevedo-Quintanilha et al., 2020). Sabe-se que os macrófagos ativado apresentam como principal mecanismo microbicida a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO), respectivamente, e são importantes para eliminação do parasito por meio da explosão oxidativa; no entanto, são responsáveis por causar intenso dano oxidativo às membranas das células. Nosso estudo mostra que há uma produção significativa de  $H_2O_2$  pelas células no pulmão dos animais infectados, independentemente da suplementação, sugerindo que as células inflamatórias estão super ativadas nesses animais e que o DHA não é capaz de atuar nas vias que controlam a resposta inflamatória de animais infectados com PbN.

Para melhor caracterizar a resposta inflamatória, nós avaliamos o perfil fenotípico dos leucócitos nos tecidos pulmonar e esplênico. Nossos dados mostraram que houve um infiltrado significativo dessas células em ambos os órgãos dos grupos infectados, especialmente de monócitos inflamatórios e de linfócitos T (CD8+ e CD4+). Embora não tenha havido diferença significativa, o grupo suplementado apresentou uma tendência de maior recrutamento celular referente ao compartimento mielóide no pulmão, em relação ao grupo PbN. Em contrapartida, no baço, foi verificada uma tendência à redução de linfócitos T, tanto CD4+ quanto CD8+, nos animais que receberam a suplementação comparados àqueles apenas infectados. Estudos anteriores já demonstraram que na malária

murina por PbN, ocorre um aumento de 20 vezes no número de linfócitos T CD8+ infiltrados no pulmão 10 dias após a infecção e que essas células parecem contribuir de forma significativa para o desenvolvimento da patologia pulmonar, uma vez que sua deleção com anticorpos anti-CD8 leva a redução o edema alveolar e a infiltração celular (Van Den Steen et al., 2010). Realmente, em nosso modelo de infecção murina com PbA (David-Vieira et al., 2024; Carpinter et al., 2024) a suplementação com óleo de peixe rico em DHA reduziu significativamente o número de monócitos inflamatórios e de linfócitos T CD8+ tanto no pulmão quanto no cérebro dos animais infectados.

É também sabido que o equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias é indispensável para o controle da infecção e o retorno à homeostase (Anstey et al., 2009). Em nosso estudo, verificou-se aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 no pulmão dos animais infectados e a suplementação com DHA não foi capaz de alterar esse perfil. Esses dados vão ao encontro de estudos anteriores que demonstraram que a principal fonte dessas citocinas são os macrófagos e linfócitos ativados e que a gravidade da doença está relacionada à produção de citocinas pró-inflamatórias tanto em modelos murinos (Stevenson; Riley, 2004) como em humanos (Gonçalves et al., 2012). Além disso, um estudo recente mostrou que a malária induzida por PbN é caracterizada por níveis aumentados de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  a partir do 7º dia de infecção (Vieira-Santos et al., 2024). Em relação à produção de IL-10, nosso trabalho mostrou que os animais PbN e DHA/PbN apresentaram níveis elevados da citocina, quando comparados ao grupo controle. De modo geral, níveis aumentados desta citocina estão associados a efeitos anti-inflamatórios (Moore et al., 2001; Maynard et al., 2008; Joss et al., 2000). No entanto, o estudo de Taylor e colaboradores sugere que níveis elevados de IL-10 em pacientes adultos com malária *falciparum* estão associados a uma pior evolução clínica da doença, podendo culminar em morte em casos graves sem acometimento cerebral (Taylor et al., 2012). Ademais, níveis aumentados de IL-10 no início do desenvolvimento de SDRA não associada à malária estão relacionados a um pior prognóstico da doença (Liu et al., 2017). Outro estudo demonstrou um aumento excessivo na produção de IL-10 em modelo murino de infecção induzido por *P. berghei* K173, mas não por PbA e que o bloqueio dessa citocina impediu o desenvolvimento da SDRA-AM. Além disso,

Mukherjee e colaboradores também constataram que a infecção e a produção exacerbada de IL-10 estavam associadas a um descontrole da resposta imune antimicrobiana, resultando em uma disbiose pulmonar, diretamente relacionada ao desenvolvimento do quadro clínico (Mukherjee et al., 2022). Embora não tenhamos avaliado parâmetros associados à microbiota, é possível hipotetizar que tanto o PbN quanto o *Pb. K173* levam ao desenvolvimento da SDRA por meio de alteração da microbiota pulmonar. Sendo assim, mais estudos são necessários para entender os mecanismos associados à imunopatologia SDRA quando na presença de distintas cepas/espécies de plasmódios.

Ainda nesse estudo nós demonstramos que a cepa NK65 de *P. berghei*, assim como a cepa ANKA, é capaz de levar a alterações intestinais (morfométricas e teciduais), alterando sua permeabilidade, ao passo que a suplementação dietética com ômega 3 rico em DHA parece, pelo menos parcialmente, minimizar tais efeitos da infecção. Esse achado é de grande relevância, visto que estudos prévios já demonstraram que o aumento da permeabilidade intestinal favorece a disbiose e a translocação de bactérias para a lâmina própria, ocasionando a quebra de tolerância a antígenos alimentares e microbianos, levando à ativação da resposta imune e inflamação da mucosa intestinal (Taniguchi et al., 2015; Sriboonvorakul et al., 2023). As vias pelas quais os componentes do ômega-3 podem atuar mediando tal proteção precisam ser investigadas. Contudo, Robertson e colaboradores demonstraram que a suplementação dietética com ômega-3 favorece o crescimento de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta, como butirato e acetato (Robertson et al., 2018). O butirato, por exemplo, é visto por ter efeito anti-inflamatório, uma vez que atua inibindo a ativação do NF-KB (Meijer et al., 2010) dentre outros mecanismos. Já o acetato, em modelo intestinal, parece atuar aumentando a expressão de genes de barreira (tais como claudina 4), além de modular a expressão de defensinas, reduzindo o estresse oxidativo no intestino (Salieri et al., 2022). Contudo, no modelo de malária, esses mecanismos permanecem por ser esclarecidos.

Em síntese, embora pareça atenuar as lesões intestinais induzidas pela infecção com *P. berghei* NK65, os dados apresentados neste estudo demonstram que a suplementação com óleo de peixe rico em DHA não resulta em proteção contra as alterações pulmonares. Esse achado diverge do observado em nosso

estudo prévio onde as lesões pulmonares induzidas pela cepa ANKA de *P. berghei* foram mitigadas pela administração oral de ômega 3 (22) bem como de outros estudos que demonstraram que a administração de mediadores lipídicos derivados de DHA foi associada à redução da inflamação, atenuação do dano tecidual pulmonar (Wang et al., 2011; Wang et al., 2014) e de disfunções de barreiras epiteliais causadas por diferentes patógenos (Serhan et al., 2018; Basil; Levy, 2016).

Uma hipótese para explicar essa discrepância entre as cepas NK65 e ANKA é que a cepa NK65 apresente mecanismos de evasão imunológica capazes de modular a expressão de genes ou vias pelas quais atuam os mediadores lipídicos, tais como resolvinas, maresinas e protectinas. Já foi amplamente descrito que protozoários, como *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*, podem interferir no metabolismo lipídico do hospedeiro, direcionando-o para uma resposta potencialmente pró-inflamatória (revisto por Toledo et al., 2016). Dessa forma, propõe-se que *P. berghei* NK65 possa interferir, direta ou indiretamente, nas vias de síntese ou sinalização dos mediadores lipídicos derivados do DHA, neutralizando seus efeitos anti-inflamatórios e pró-resolução. Essa modulação poderia envolver, por exemplo, a inibição da expressão de enzimas-chave, como a 15-lipoxigenase (15-LOX), comprometendo a capacidade desses mediadores de contrabalançar a inflamação induzida pelo parasito. Esses achados reforçam a necessidade de se considerar a diversidade de perfis patogênicos entre cepas de *Plasmodium* ao investigar intervenções nutricionais ou imunomoduladoras, evidenciando que potenciais estratégias adjuvantes no manejo da malária devem ser cuidadosamente validadas em diferentes modelos biológicos antes de sua extrapolação para cenários clínicos.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a suplementação com óleo de peixe rico em DHA não foi eficaz na proteção contra alterações pulmonares decorrentes da infecção por PbN. Contudo, observou-se que a suplementação dietética associou-se parcialmente à proteção contra alterações intestinais associadas à infecção. Dessa forma, é possível inferir que os efeitos protetores previamente atribuídos ao óleo de peixe, observados em modelos experimentais de

infecção com *Plasmodium berghei* ANKA, não se reproduzem no contexto da infecção por *Plasmodium berghei* NK65 no âmbito pulmonar. Essa diferença pode estar relacionada às diferenças intrínsecas entre as cepas, que apresentam distintas características biológicas e imunopatológicas, resultando em cursos clínicos e respostas inflamatórias diferentes. Esses achados ressaltam a importância de se considerar a variabilidade entre modelos experimentais ao se investigar estratégias terapêuticas baseadas em modulação nutricional da resposta imune.

## 8. REFERÊNCIAS

Abdalla, S. H. Peripheral Blood And Bone Marrow Leucocytes In Gambian Children With Malaria: Numerical Changes And Evaluation Of Phagocytosis. ***Annals Of Tropical Pediatrics***, v. 8, n. 4, p. 250–8, 1988.

Alamer, Edrous et al. Dissemination of non-typhoidal Salmonella during Plasmodium chabaudi infection affects anti-malarial immunity. ***Parasitology research***, v. 118, n. 7, p. 2277-2285, 2019.

Albuquerque, Nathalia Rammé M. de; Ladeia, Winni A.; Scalsky, Ryan J.; Dwivedi, Ankit; Stabler, Thomas C.; Rodrigues Priscila T.; Oliveira, Thaís C. de; Silva, Joana C.; Ferreira, Marcelo U. Plasmodium simium: birth and evolution of a zoonotic malaria parasite species. ***Parasitology***, v. 1, p. 1–12, 2025.

Almeida, Ic & Gazzinelli, Rt. Atividade Pró-Inflamatória De Âncoras De Glicosilfosfatidilinositol Derivadas De *Trypanosoma Cruzi* : Análises Estruturais E Funcionais. ***J. Leukoc. Biol.*** n. 70, p. 467–477 2001.

Amante, F. H. et al. Immune-Mediated Mechanisms Of Parasite Tissue Sequestration During Experimental Cerebral Malaria. ***J Immunol***, v. 185, n. 6, p. 3632– 3642, 2010.

Amino, Rogerio et al. Quantitative Imaging Of Plasmodium Transmission From Mosquito To Mammal. ***Nature Medicine***, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.

Anstey, N.M.; Russell, B.; Yeo, T.W.; Price, R.N. The pathophysiology of vivax malaria. ***Trends Parasitol.***, v. 25 (5), p. 220–227, 2009.

Anstey Nm, Sp Jacups, T Cain, T Pearson, Pj Ziesing, Da Fisher, Bj Currie, Pj Marks, And Gp Maguire. Pulmonary Manifestations Of Uncomplicated Falciparum And Vivax Malaria: Cough, Small Airways Obstruction, Impaired Gas Transfer, And Increased Pulmonary Phagocytic Activity. ***J Infect Dis***, 185:1326-34, 2002.

Anstey Nm, T Handojo, Mc Pain, E Kenangalem, E Tjitra, Rn Price, And Gp Maguire. Lung Injury In Vivax Malaria: Pathophysiological Evidence For Pulmonary Vascular Sequestration And Posttreatment Alveolar-Capillary Inflammation. **J Infect Dis**, 195:589-96, 2007.

Antinori S, L Galimberti, L Milazzo, And M Corbellino. Biology Of Human Malaria Plasmodia, Including Plasmodium Knowlesi. **Mediterr J Hematol Infect Dis**. 4:E2012013, 2012.

Aredes, Mariah Azevedo et al. Efficacy of  $\omega$ -3 supplementation on nutritional status, skeletal muscle, and chemoradiotherapy toxicity in cervical cancer patients: a randomized, triple-blind, clinical trial conducted in a middle-income country. **Nutrition**, v. 67, n. 110528, 2019.

Arese, P.; Schwarzer, E. Malarial Pigment (Hemozoin): A Very Active "Inert" Substance. **Annals Of Tropical Medicine And Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 501-516, 1997.

Artavanis-Tsakonas, K.; Tongren, J. E.; Riley, E. M. The War Between The Malaria Parasite And The Immune System: Immunity, Immunoregulation And Immunopathology. **Clinical And Experimental Immunology**, v. 133, n. 2, p. 145–152, 2003.

Ashley, E. A.; Pyae Phyo, A.; Woodrow, C. J. Malaria. **The Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1608-1621, 2018.

Bano, N.; Romano, J. D.; Jayabalasingham, B.; Coppens, I. Cellular Interactions Of Plasmodium Liver Stage With Its Host Mammalian Cell. **International Journal For Parasitology**, v. 37, n. 12, p. 1329 - 1341, 2007.

Baptista, Fernanda G. et al. Accumulation Of Plasmodium Berghei-Infected Red Blood Cells In The Brain Is Crucial For The Development Of Cerebral Malaria In Mice. **Infection And Immunity**, v. 78, n. 9, p. 4033-4039, 2010.

Basil, Maria C.; Levy, Bruce D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 51-67, 2016.

Blanloeil Y, D Baron, Ay De Lajartre, And F Nicolas. [Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) In Cerebral Malaria (Author's Transl)]. **Sem Hop**, 56:1088-90, 1980.

Blok, Willem L. et al. Dietary fish-oil supplementation in experimental gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 5, p. 898-903, 1992.

Boivin, M. J.; Bangirana, P.; Byarugaba, J.; Opoka, R. O.; Idro, R.; Jurek, A. M.; John, C. C. Cognitive Impairment After Cerebral Malaria In Children: A Prospective Study. ***Pediatrics***, v. 119, No. 2, 2007.

Brasil, Patrícia et al. Outbreak Of Human Malaria Caused By Plasmodium Simium In The Atlantic Forest In Rio De Janeiro: A Molecular Epidemiological Investigation. ***The Lancet Global Health***, n. 5, n. 10, p. 1038-1046, 2017.

Braz-de-Melo, Heloísa Antoniella et al. Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. ***Scientific reports***, v. 9, n. 1, p. 20119, 2019.

Bronzan, Rachel N. et al. Bacteremia in Malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome. ***The Journal of Infectious Diseases***, v. 195, n. 6, p. 895-904, 2007.

Brooks, Marion H. et al. Acute Pulmonary Edema In Falciparum Malaria: A Clinicopathological Correlation. ***New England Journal Of Medicine***, v. 279, n. 14, p. 732-737, 1968.

Broz P, And Dm Monack. Newly Described Pattern Recognition Receptors Team Up Against Intracellular Pathogens. ***Nat Rev Immunol***, 13:551-65, 2013.

Bruce-Chwatt, L. J. Alphonse Laveran's Discovery 100 Years Ago And Today's Global Fight Against Malaria. ***Journal Of The Royal Society Of Medicine***, v. 74, 1981.

Budden, Kurtis F. et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. ***Nature Reviews Microbiology***, v. 15, n. 1, p. 55-63, 2017.

Calder, Philip C. Docosahexaenoic Acid. ***Annals Of Nutrition And Metabolism***, v. 69, N.Suppl. 1, p. 8-21, 2016.

Calder, Philip C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. ***Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids***, v. 77, n. 5-6, p. 327-335, 2007.

Calder, Philip C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids***, v. 1851, n. 4, p. 469-484, 2015.

Carpinter, Bárbara Albuquerque et al. Dha-Rich Fish Oil Plays A Protective Role Against Experimental Cerebral Malaria By Controlling Inflammatory And Mechanical Events From Infection. ***The Journal Of Nutritional Biochemistry***, v. 123, p. 109492, 2024.

Carvalho Bo, Sc Lopes, Pa Nogueira, Pp Orlandi, Dy Bargieri, Yc Blanco, R Mamoni, Ja Leite, Mm Rodrigues, Is Soares, Tr Oliveira, G Wunderlich, Mv Lacerda, Ha Del Portillo, Mo Araujo, B Russell, R Suwanarusk, G Snounou, L Renia, and Ft Costa. On The Cytoadhesion Of Plasmodium Vivax-Infected Erythrocytes. ***J Infect Dis***, 202:638-47, 2010.

Casals-Pascual C, Idro R, Picot S, Roberts Dj, Newton Crjc. Can Erythropoietin Be Used To Prevent Brain Damage In Cerebral Malaria? *Trends Parasitol*, v. 25, p.30-36, 2008.

Casals-Pascual, Climent et al. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood*, v. 108, n. 8, p. 2569-2577, 2006.

Castro, Ivone; Del Carmen Rodríguez, María. Análisis Proteómico De Plasmodium, El Agente Causal De La Malaria. *Salud Pública De México*, v. 51, 2009.

Centrals For Disease Control And Prevention, 2021.

Chau, Jennifer Y. et al. Malaria-associated L-arginine deficiency induces mast cell-associated disruption to intestinal barrier defenses against nontyphoidal Salmonella bacteremia. *Infection and immunity*, v. 81, n. 10, p. 3515-3526, 2013.

Church, James; MAITLAND, Kathryn. Invasive bacterial co-infection in African children with Plasmodium falciparum malaria: a systematic review. *BMC Medicine*, v. 12, n. 1, p. 31, 2014.

Clark, I. A. Cell-mediated immunity in protection and pathology of malaria. *Parasitology Today*, v. 3, n. 10, p. 300-305, 1987.

Collins, W. E. Plasmodium Knowlesi: A Malaria Parasite Of Monkeys And Humans. *Annu Rev Entomol*, 57:107-21, 2012.

Costantini, Lara et al. Impact of omega-3 fatty acids on the gut microbiota. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 12, p. 2645, 2017.

Constanzo, L. Fisiología. 4<sup>o</sup>ed, 2014.

Cowman, A. F.; Julie, C.; Marapana, D. Malaria: Biology And Disease. *Cell*, v. 167, n. 3, p. 610–624, 2016.

Cowman, Alan F. et al. Malaria: Biology And Disease. *Cell*, V. 167, N. 3, P. 610-624, 2016. Tavares, J.; Formaglio, P.; Thiberge, S.; Mordelet, E.; Van Rooijen, N.; Medvinsky, A.; Ménard, R.; Amino, R. Role Of Host Cell Traversal By The Malaria Sporozoite During Liver Infection. *Journal Of Experimental Medicine*, v. 210, n. 5, p. 905-915, 2013.

Cox, F. E. History Of The Discovery Of The Malaria Parasites And Their Vectors. *Parasites E Vectors*, v. 3, n. 1, p. 5, 2010.

David-Vieira, Carolina et al. Lung Damage Induced By Plasmodium Berghei Anka In a Murine Model Of Malarial Infection Is Mitigated By Dietary Supplementation With DHA-rich omega-3. *Acs Infectious Diseases*, 2024

Day, N. P. J.; Phu, N. H.; Mai, N. T. H.; Chau, T. T. H.; Loc, P. P.; Chuong, L. Van; Sinh, D. X.; Holloway, P.; Hein, T. T.; White, N. J. The Pathophysiologic And Prognostic Significance Of Acidosis In Severe Adult Malaria, **Critical Care Medicine**, v. 28, No. 6, p. 1833-1840, 2000.

De Azevedo-Quintanilha, Isaclaudia G. et al. Haem Oxygenase Protects Against Thrombocytopaenia And Malaria-Associated Lung Injury. **Malaria Journal**, v. 19, p. 1-16, 2020.

De Souza Jb, Jc Hafalla, Em Riley, And Kn Couper. Cerebral Malaria: Why Experimental Murine Models Are Required To Understand The Pathogenesis Of Disease. **Parasitology**,137:755-72 2010a.

De Souza, J. Brian; Riley, Eleanor M. Cerebral Malaria: The Contribution Of Studies In Animal Models To Our Understanding Of Immunopathogenesis. **Microbes And Infection**, v. 4, n. 3, p. 291-300, 2002.

Deane, L. M. Malaria Vectors In Brazil. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 5-14, 1986.

Dobbs, Katherine R.; Crabtree, Juliet N.; Dent, Arlene E. Innate immunity to malária: the role of monocytes. **Immunological reviews**, v. 293, n. 1, p. 8-24, 2020.

Dormans Jama. Morphology, function, and response of pulmonary type I cells: a review. **Inhal Toxicol.**, v. 8, p. 521–536, 1996.

Dumas, Alexia et al. The Role Of The Lung Microbiota And The Gut–Lung Axis In Respiratory Infectious Diseases. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 12, p. E12966, 2018.

Elliot SR, Zaw MT, Lin Z, Han Z, Hossain MS, Cui L. Mechanistic insights into the interaction between the host gut microbiome and malaria. **Front Cell Infect Microbiol.**; v.12, n.1000679, 2022.

Engwerda, C. R.; Beattie, L.; Amante, F. H. The Importance Of The Spleen In Malaria. **Trends In Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 75-80, 2005.

França, Tanos Cc; Santos, Marta G. Dos; Figueroa-Villar, José D. Malária: Aspectos Históricos E Quimioterapia. **Química Nova** , v. 31, p. 1271-1278, 2008.

Freddi Na et al. Therapy with exogenous pulmonary surfactant. **Journal of Pediatrics**, vol. 79, Suppl. 2, 2003

Frevert, U.; Engelmann, S.; Zougbedé, S.; Stange, J.; Ng, B.; Matuschewski, K.; Liebes, L.; Yee, H. Intravital Observation Of Plasmodium Berghei Sporozoite Infection Of The Liver. **Plos Biology**, v. 3, n. 6, p. 1034-1046, 2005.

Fujikawa, Mariko et al. Antimalarial effects of purified and  $\alpha$ -tocopherol-fortified n-3 polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, n. 3, p. 153-157, 1993.

Garnham, Percy Cyril Claude et al. Malaria Parasites And Other Haemosporidia. **Malaria Parasites And Other Haemosporidia**, 1966.

Gaur D, And Chitnis C.E. Molecular Interactions And Signaling Mechanisms During Erythrocyte Invasion By Malaria Parasites. **Curr Opin Microbiol**, .14:422-8, 2011.

Gazzinelli, R. T. & Denkers, E. Y. Protozoan Encounters With Toll-Like Receptor Signaling Pathways: Implications For Host Parasitism. **Nature Rev. Immunol**. 6, 895–906, 2006.

Gazzinelli, Ricardo T. et al. Innate Sensing Of Malaria Parasites. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744-757, 2014.

Giacalone Vd, Margaroli C, Mall Ma, Tirouvanziam R. Neutrophil Adaptations Upon Recruitment To The Lung: New Concepts And Implications For Homeostasis And Disease. **Int J Mol Sci**, v. 28, p. 851, 2020.

Godfrey, D. G. et al. Antiparasitic Action of Dietary God Liver Oil upon Plasmodium berghei and its Reversal by Vitamin" E". **Experimental Parasitology**, v. 6, n. 6, p. 555-65, 1957.

Gomes, Andréia Patrícia et al. Malária Grave Por Plasmodium Falciparum. **Revista Brasileira De Terapia Intensiva**, v. 23, p. 358-369, 2011.

Gonçalves, R. M.; Scopel, K. K. G.; Bastos, M. S.; Ferreira, M. U. Cytokine Balance in Human Malaria: Does *Plasmodium Vivax* Elicit More Inflammatory Responses than *Plasmodium falciparum*? **PLoS One**, v. 7 (9), n. e44394, 2012.

Grau Ge, Piguet Pf, Gretener D, Vesin C, Lambert Ph. Immunopathology Of Thrombocytopenia In Experimental Malaria. **Immunology**, 65:501, 1988.

Griffing, S. M.; Tauil, P.; Udhayakumar, V.; Silva-Flannery, L. A Historical Perspective On Malaria Control In Brazil. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 701-7018, 2015.

Gupta, Narendra Kumar et al. Study of Thrombocytopenia in Patients of Malaria. **Tropical Parasitology**, v. 3, n. 1, p. 58-61, 2013.

Hainault, I.; Carlotti, M.; Hajduch, E.; Guichard, C.; Lavau, M. Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipidemia, and adipocyte insulin resistance in rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 683, n. 14, p. 98-101, 1993.

Hawass, Z.; Yehia, Z. G.; Ismail, S.; Khairat, R.; Fathalla, D.; Hasan, N.; Ahmed, A.; Elleithy, H.; Ball, M.; Gaballah, F.; Wasef, S.; Fateen, M. P.; Amer, H.; Gostner, P.; Selim, A. M. C. Ancestry And Pathology In King Tutankhamun's Family. **Journal Of American Medical Association**, v. 303, n. 7, 2010.

Haydoura S, O Mazboudi, K Charafeddine, I Bouakl, Ta Baban, At Taher, And Ss Kanj. Transfusion-Related Plasmodium Ovale Malaria Complicated By Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) In A Non-Endemic Country. **Parasitol Int**, 60:114-6, 2010.

Hermesen, C. et al. Depletion Of Cd4+ Or Cd8+ T-Cells Prevents *Plasmodium berghei*-Induced Cerebral Malaria In End-Stage Disease. **Parasitology**, v. 114 ( Pt 1, N. March 1996, p. 7–12, 1997.

Idro, R.; Jenkins, N. E.; Newton, C. R. J. Pathogenesis, Clinical Features, And Neurological Outcome of Cerebral Malaria. **Lancet Neurology**, v. 4, n. 12, p. 827-840, 2005.

Jani, D. et al. HDP — A Novel Heme Detoxification Protein From The Malaria Parasite. **Plos Pathog**. 4, E1000053, 2008.

Joss, A.; Akdis, M.; Faith, A.; Blaser, K.; Akdis, C. A. IL-10 Directly Acts on T Cells by Specifically Altering the CD28 Co-Stimulation Pathway. **Eur. J. Immunol.**, v. 30 (6), p. 1683–1690, 2000.

Karney, W. W. & Tong, M. J. Malabsorption in Plasmodium falciparum malaria. **Am J Trop Med Hyg**, n. 21, p. 1–5 ,1972.

Keely, Simon; Talley, Nicholas J.; Hansbro, Philip M. Pulmonary-Intestinal Cross-Talk In Mucosal Inflammatory Disease. **Mucosal Immunology**, v. 5, n. 1, p. 7-18, 2012.

Kong, W.; Yen, J.; Vassiliou, E.; Adhikary, S.; Toscano, M. G.; Ganea, D. Docosahexaenoic Acid Prevents Dendritic Cell Maturation And In Vitro And In Vivo Expression Of The IL-12 Cytokine Family. **Lipids In Health And Disease**, v. 9, p. 1-10, 2010.

Krey, G.; Braissant, O.; L'horset, F.; Kalkhoven, E.; Perroud, M.; Parker, M. G.; Wahli, W. Fatty Acids, Eicosanoids, And Hypolipidemic Agents Identified As Ligands Of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors By Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 6, p. 779-791, 1997.

Kronmann N, Green A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland: incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Med Scand**. ;208:401–6, 1980.

Lacerda Mv, Mp Mourao, Hc Coelho, And Jb Santos. Thrombocytopenia In Malaria: Who Cares? **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2011.106 Suppl 1:52-63.

Lacerda MV, Sc Fragoso, Mg Alecrim, Ma Alexandre, Bm Magalhaes, Am Siqueira, Lc Ferreira, Jr Araujo, Mp Mourao, M Ferrer, P Castillo, L Martin-Jaular, C Fernandezbecerra, H Del Portillo, J Ordi, PI Alonso, And Q Bassat. Postmortem Characterization Of Patients With Clinical Diagnosis Of Plasmodium Vivax Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill? **Clin Infect Dis.**,55:E67-74, 2012a.

Lacerda, Marcus Vinícius Guimarães et al. The Neglected Plasmodium Vivax: Are Researchers From Endemic Areas Really Concerned About New Treatment Options?. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 40, p. 489-490, 2007.

Levander, Orville A. et al. Qinghaosu, dietary vitamin E, selenium, and cod-liver oil: effect on the susceptibility of mice to the malarial parasite Plasmodium yoelii. **The American journal of clinical nutrition**, v. 50, n. 2, p. 346-352, 1989.

Ley K, Hoffman Hm, Kubes P, Cassatella Ma, Zychlinsky A, Hedrick Cc, Et Al. Neutrophils: New Insights And Open Questions. **Sci Immunol**, v. 3, 2018.

Linder, S. E.; Miller, J. L.; Kappe, S. H. I. Malaria Parasite Pre-Erythrocytic Infection: Preparation Meets Opportunity. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 3, 2012.

Liu, C. H. et al. Early measurement of IL-10 predicts the outcomes of patients with acute respiratory distress syndrome receiving extracorporeal membrane oxygenation. **Sci. Rep.** 7, 1021, 2017.

Lovegrove, F. E.; Gharib, S. A.; Peña-Castillo, L.; et al. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 5, p. e1000068, 2008.

Lozano F, M Leal, E Lissen, J Munoz, A Bautista, And C Regordan. *P. Falciparum* and *P. Malariae* Malaria Complicated by Pulmonary Edema with Disseminated Intravascular Coagulation. **Presse Med**,12:3004-5, 1983.

Macpherson Gg, Mj Warrell, Nj White, S Looareesuwan, And Da Warrell. Human Cerebral Malaria. A Quantitative Ultrastructural Analysis Of Parasitized Erythrocyte Sequestration. **Am J Pathol**, 119:385-401, 1985.

Mantovani, A, Sica, A, Locati, M. Macrophage Polarization Comes Of Age. **Immunity**, v. 23, p.344–6, 2005.

Marsh, K. et al. The Pathogenesis Of Severe Malaria In African Children. *Annals Of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 90, n. 4, p. 395-402, 1996.

Martin, Clayton Antunes et al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. **Revista de Nutrição - Campinas**, v. 19, n. 6, p. 761, 2006.

Martinez Fo, Gordon S. The M1 And M2 Paradigm Of Macrophage Activation: Time For Reassessment. **Prime Rep**, v. 3, p. 1–13, 2014.

Mathew, A. J.; George, J. Acute Kidney Injury In The Tropics. **Annals Of Saudi Medicine**, v. 31, n. 5, p. 451-456, 2011.

Maynard, C. L.; Weaver, C. T. Diversity in the Contribution of Interleukin-10 to T-cell-mediated Immune Regulation. **Immunol. Rev.**, v. 226 (1), p. 219–233, 2008.

Meijer, Kees; De Vos, Paul; Priebe, Marion G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health?. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 13, n. 6, p. 715-721, 2010.

Miller, Louis H. et al. The Pathogenic Basis Of Malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673-679, 2002.

Ministério Da Saúde, 2023.

Mohan A, Sk Sharma, And S Bollineni. Acute Lung Injury And Acute Respiratory Distress Syndrome In Malaria. **J Vector Borne Dis**, 45:179-93, 2008.

Mooney, Jason P. et al. Inflammation-associated alterations to the intestinal microbiota reduce colonization resistance against non-typhoidal Salmonella during concurrent malaria parasite infection. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 14603, 2015.

Moore, K. W.; de Waal Malefyt, R.; Coffman, R. L.; O'Garra, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683–765, 2001.

Montes De Oca, M. et al. The Impact Of Established Immunoregulatory Networks On Vaccine Efficacy And The Development Of Immunity To Malaria. **The Journal Of Immunology**, v. 197, n. 12, p. 4518–4526, 2016.

Morales-Nebreda L, Misharin A V., Perlman H, Scott Budinger Gr. The Heterogeneity Of Lung Macrophages In The Susceptibility To Disease. **Eur Respir Ver**, v. 24, p. 505–9, 2015.

Mukherjee, Debanjan et al. Host lung microbiota promotes malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 3747, 2022.

Nerlich, A. Paleopathology And Paleomicrobiology Of Malaria. **Paleomicrobiology Of Humans**, p. 155-160, 2016.

Neres, R.; Marinho, C. R. F.; Gonçalves, L. A.; Catarino, M. B.; Penha-Gonçalves, C. Pregnancy outcome and placenta pathology in Plasmodium berghei ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. e1608, 2008.

Nguyen, P. H., Day, N., Pram, T. D., Ferguson, D. J. & White, N. J. Intraleucocytic Malaria Pigment And Prognosis In Severe Malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 89, 200–204, 1995.

Niikura, M.; Inoue, S.-I.; Kobayashi, F. Role of Interleukin-10 in Malaria: Focusing on Coinfection with Lethal and Nonlethal Murine Malaria Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

Novak, T. E.; Babcock, T. A.; Jho, D. H.; Helton, W. S.; Espat, N. J. Nf-Kappa B Inhibition By Omega-3 Fatty Acids Modulates Lps-Stimulated Macrophage Tnf-Alpha Transcription. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 284, n. 1, p. L84-9, 2003.

Pain A, Dj Ferguson, O Kai, Bc Urban, B Lowe, K Marsh, And Dj Roberts. Platelet-Mediated Clumping Of Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes Is A Common Adhesive Phenotype And Is Associated With Severe Malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001.98:1805-10.

Pamplona, A.; Hanscheid, T.; Epiphany, S.; Mota, M. M.; Vigário, A. M. Cerebral malaria and the hemolysis/methemoglobin/heme hypothesis: shedding new light on an old disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 4, p. 711–6, 2009.

Parks, Dale A.; BULKLEY, Gregory B.; GRANGER, D. Neil. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. **Surgery**, v. 94, n. 3, p. 415-422, 1983.

Pinzón-Charry, A. et al. Low Doses Of Killed Parasite In Cpg Elicit Vigorous Cd4+ T Cell Responses Against Blood-Stage Malaria In Mice. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 120, n. 8, p. 2967–2978, 2010.

Pratt-Riccio, Lilian Rose, et al. Uso De Modelos De Primatas Neotropicais Para Pesquisa Em Malária: Um Histórico Dos 25 Anos De Colaboração Entre O Laboratório De Pesquisa Em Malária (loc, Fiocruz) E O Centro Nacional De Primatas (Iec, Svs). 2021.

Rajput R, H Singh, S Singh, Meena, And Uc Tiwari. Pulmonary Manifestations In Malaria. **J Indian Med Assoc**, 98:612-4, 2000.

Robertson, Ruairi C. et al. Maternal omega-3 fatty acids regulate offspring obesity through persistent modulation of gut microbiota. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 95, 2018.

Rodríguez-Cruz, Maricela; Serna, Donovan Solís. Nutrigenomics Of  $\Omega$ -3 Fatty Acids: Regulators Of The Master Transcription Factors. **Nutrition**, v. 41, p. 90-96, 2017.

Rogerson, S. J.; Chaiyaroj, S. C.; Ng, K.; Reeder, J. C.; Brown, G. V. Chondroitin Sulfate A Is a Cell Surface Receptor For Plasmodium Falciparum- Infected Erythrocytes. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 182, n. 1, p. 15-20, 1995.

Ruzickova, J.; Rossmeisl, M.; Prazak, T.; Flachs, P.; Sponarova, J.; Veck, M.; ET AL. Omega-3 PUFA of marine origin limits diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. **Lipids**, v. 39, n. 12, p. 1177-1185, 2004.

Saleri, Roberta et al. Effects of different short-chain fatty acids (SCFA) on gene expression of proteins involved in barrier function in IPEC-J2. **Porcine Health Management**, v. 8, n. 1, p. 21, 2022.

Sallares, R.; Gomzi, S. Biomolecular Archaeology Of Malaria. **Ancient Biomolecules**, v. 3, p. 195-213, 2001.

Sánchez-Lara, Karla et al. Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: randomized trial. **Clinical nutrition**, v. 33, n. 6, p. 1017-1023, 2014.

Schofield L, And Ge Grau. Immunological Processes In Malaria Pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, 5:722-35, 2005.

Schofield L. Intravascular Infiltrates And Organ-Specific Inflammation In Malaria Pathogenesis. **Immunol Cell Biol**.85:130-7, 2007.

Schofield, L. & Hackett, F. Signal Transduction In Host Cells By A Glycosylphosphatidylinositol Toxin Of Malaria Parasites. **J. Exp. Med.** 177, 145–153,1993.

Schofield, L. et al. Glycosylphosphatidylinositol Toxin Of *Plasmodium* Up-Regulates Intercellular Adhesion Molecule-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1, And E-Selectin Expression In Vascular Endothelial Cells And Increases Leukocyte And Parasite Cytoadherence Via Tyrosine Kinase-Dependent Signal Transduction. **J. Immunol.** 156, 1886–1896, 1996.

Shio, M. T.; Kassa, F. A.; Bellemare, M. J.; Oliver, M. Innate Inflammatory Response To The Malarial Pigment Hemozoin. **Microbes And Infection**, v. 12, n. 12-13, p. 889-899, 2010.

Segal, H. E. et al. Gastrointestinal function, quinine absorption, and parasite response in falciparum malaria. **J South-East Asian Trop Med Public Health**, n. 5, p. 499–503, 1974.

Serhan, Charles N. et al. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 7, p. 2657-2669, 2018.

Sey, Isatou CM et al. Does malaria cause diarrhea? A systematic review. **Frontiers in medicine**, v. 7, p. 589379, 2020.

Silva, Paula Simplício da et al. Omega-3 supplementation on inflammatory markers in patients with chronic Chagas cardiomyopathy: a randomized clinical study. **Nutrition journal**, v. 16, n. 1, p. 36, 2017.

Simopoulos, A. P. The Importance of the Ratio of Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acids. **Biomed. Pharmacother**, v. 56 (8), p. 365– 379, 2002.

Singer, P.; Shapiro, H. Omega-3 Enteral Nutrition in Acute Respiratory Distress Syndrome. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 12 (2), 123–128, 2009.

Singh, B.; Daneshvar, C. Human Infections And Detection Of Plasmodium Knowlesi. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 26, ed. 2, p. 165-184, 2013.

Sokol, C.L.; Luster, A.D. The Chemokine System In Innate Immunity. **Cold Spring Harb. Perspect Biol**, v. 7, 2015.

Song, Hun Ho et al. Clinical features of Plasmodium vivax malaria. **The Korean journal of internal medicine**, v. 18, n. 4, p. 220, 2003.

Souza, J. B. De; Riley, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and infection/Institut Pasteur**, v. 4, n. 3, p. 291–300, 2002.

Souza, M. C.; Silva, J. D.; Pádua, T. A.; et al. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 186, n. 1, p. 65–72, 14 2013.

Souza, Rodrigo M. et al. Placental histopathological changes associated with Plasmodium vivax infection during pregnancy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 2, p. e2071, 2013.

Sriboonvorakul, Natthida et al. Intestinal injury and the gut microbiota in patients with Plasmodium falciparum malaria. **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 10, p. e1011661, 2023.

Stanisic, D. I.; Good, M. F. Whole Organism Blood Stage Vaccines Against Malaria. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7469–7475, 2015.

Stevenson, M. M.; Riley, E. M. Innate Immunity To Malaria. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 3, p. 169–180, 2004.

Stuart Lm, N Paquette, And L Boyer. Effector-Triggered Versus Pattern-Triggered Immunity: How Animals Sense Pathogens. **Nat Rev Immunol**, 13:199-206, 2013.

Sturm A, Amino R, Van De Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok J, Menard R, Heussler V. Manipulation Of Host Hepatocytes By The Malaria Parasite For Delivery Into Liver Sinusoids. **Science**, v.313, p.1287-1290, 2006.

Sun, Grace Y. et al. Docosahexaenoic acid (DHA): An essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 136, p. 3-13, 2018.

Tachado, S. D. et al. Glycosylphosphatidylinositol Toxin Of *Plasmodium* Induces Nitric Oxide Synthase Expression In Macrophages And Vascular Endothelial Cells By A Protein Tyrosine Kinase-Dependent And Protein Kinase C-Dependent Signaling Pathway. **J. Immunol.** 156, 1897–1907 1996.

Tachado, S. D.; Gerold, P.; Mcconville, M. J.; Baldwin, T.; Quilici, D.; Schwarz, R. T.; Schofield, L. Glycosylphosphatidylinositol Toxin Of *Plasmodium* Induces Nitric Oxide Synthase Expression In Macrophages And Vascular Endothelial Cells By A Protein Tyrosine Kinase-Dependent And Protein Kinase C-Dependent Signaling Pathway. **The Journal Of Immunology**, n. 156, p. 1897-1907, 1995.

Tadei, Wanderli Pedro; Dutary Thatcher, Bedsy. Malaria Vectors In The Brazilian Amazon: Anopheles Of The Subgenus Nyssorhynchus. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo**, v. 42, p. 87-94, 2000.

Tan, Lionel Kk et al. Acute Lung Injury And Other Serious Complications Of *Plasmodium Vivax* Malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 7, p. 449-454, 2008.

Taniguchi, Tomoyo et al. *Plasmodium berghei* ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 15699, 2015.

Taylor Wr, And N.J. White. Malaria And The Lung. **Clin Chest Med** 2002.23:457-68.

Taylor Wr, J Hanson, Gd Turner, Nj White, And Am Dondorp. Respiratory Manifestations Of Malaria. **Chest**, 142:492-505, 2012.

Taylor Wr, V Canon, And Nj White. Pulmonary Manifestations Of Malaria: Recognition And Management. **Treat Respir Med**, 5:419-28, 2006.

Trampuz, Andrej et al. Clinical Review: Severe Malaria. **Critical Care**, v. 7, n. 4, p. 1-9, 2003.

Toledo, Daniel AM; D'ávila, Heloísa; Melo, Rossana CN. Host lipid bodies as platforms for intracellular survival of protozoan parasites. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 174, 2016.

Treble, Timothy et al. Inhibition Of Tumour Necrosis Factor-A And Interleukin 6 Production By Mononuclear Cells Following Dietary Fish-Oil Supplementation In

Healthy Men And Response To Antioxidant Co-Supplementation. **British Journal Of Nutrition**, v. 90, n. 2, p. 405-412, 2003.

Trottein, F.; Triglia, T.; Cowman, A. F. Molecular Cloning Of A Gene From Plasmodium Falciparum That Codes For A Protein Sharing Motifs Found In Adhesive Molecules From Mammals And Plasmodia. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 129–141, 1995.

Van Den Steen, Philippe E. et al. Immunopathology And Dexamethasone Therapy In A New Model For Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 181, n. 9, p. 957-968, 2010.

Vandermosten, Leen et al. Experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome is dependent on the parasite-host combination and coincides with normocyte invasion. **Malaria journal**, v. 17, n. 1, p. 102, 2018.

Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development And Tissue Specialization. **Annu Rev Immunol**, v.13, p.643–75, 2015.

Vega, Om; Abkenari , S.; Tong, Z.; Tedman, A.; Huerta-Yepey, S. Ácidos Graxos Poliinsaturados Ômega-3 E Câncer De Pulmão: Nutrição Ou Farmacologia? **Nutr Cancer**, 73 (4), 541–561, 2021.

Vieira-Santos, Flaviane et al. Alveolar macrophages and monocyte subpopulations during Plasmodium berghei NK65 experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Heliyon**, v. 10, n. 14, 2024.

Wang, Bin et al. Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 24, n. 4, p. 434-441, 2011.

Wang, Lei et al. Effects of resolvin D1 on inflammatory responses and oxidative stress of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Chinese Medical Journal**, v. 127, n. 5, p. 803-809, 2014.

Wassmer, S. C.; Grau, G. E. R. Severe Malaria: What's New On The Pathogenesis Front? **International Journal For Parasitology**, No. September 2016.

Wassmer, S. C.; Taylor, T.; Alexander, C. Europe Pmc Funders Group Platelet-Induced Clumping Of Plasmodium Falciparum -Infected Erythrocytes From Malawian Patients With Cerebral Malaria - Possible Modulation In Vivo By Thrombocytopenia. v. 197, n. 1, p. 72–78, 2008.

White, N. J. Anemia and Malaria. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1-17, 2018.

William T, J Menon, G Rajahram, L Chan, G Ma, S Donaldson, S Khoo, C Frederick, J Jelip, Nm Anstey, And Tw Yeo. Severe Plasmodium Knowlesi Malaria In A Tertiary Care Hospital, Sabah, Malaysia. ***Emerg Infect Dis***, 17:1248-55, 2011.

Wink, David A. et al. Nitric Oxide And Redox Mechanisms In The Immune Response. ***Journal Of Leukocyte Biology***, v. 89, n. 6, p. 873-891, 2011.

World Health Organization, World malaria report 2024: Addressing inequity in the global malaria response. ***World Health Organization***, 2024.

Wright, Colin W. Recent Developments In Research On Terrestrial Plants Used For The Treatment Of Malaria. ***Natural Product Reports***, v. 27, n. 7, p. 961-968, 2010.

Yalcindag, E.; Elguero, E.; Arnathau, C.; Durand, P.; Akiana, J.; Anderson, T. J.; Aubouy, A.; Balloux.; Besnard, P.; Bogreau, H.; Carnevale, P.; D'alessandro, U.; Fontenille, D.; Gamboa, D.; Jombart, T.; Le Mire, J.; Leroy, E.; Maestre, A.; Mayxay, M.;... Prugnolle, F. Multiplique Independent Introductions Of Plasmodium Falciparum In South America. ***Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America***, v. 109, n. 2, p. 511-516, 2012.