

FERNANDO DE QUEIRÓZ CUNHA

ESTUDO FARMACOLÓGICO E FISIOPATOLÓGICO EM CAMUN
DONGOS INFECTADOS COM *Plasmodium berghei*.

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato SÉrgio Balão Cordeiro.

Fortaleza-Ceará

1 9 8 1



FERNANDO DE QUEIRÓZ CUNHA

ESTUDO FARMACOLÓGICO E FISIOPATOLÓGICO EM CAMUN
DONGOS INFECTADOS COM *Plasmodium berghei*.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA

1981

ii



FERNANDO DE QUEIRÓZ CUNHA

ESTUDO FARMACOLÓGICO E FISIOPATOLÓGICO EM CAMUN
DONGOS INFECTADOS COM *Plasmodium berghei*.

Dissertação apresentada à UFC como parte dos requisitos ne
cessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada por:

Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro

Dr. Manassés Claudino Fonteles

Dr. Talapala Govindaswamy Naidu

Universidade Federal do Ceará

1 9 8 1

iii

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº.	510033
	23 / 09 / 96

510033

R510033

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº.	1046
	05 / 11 / 90

A meus pais,
Cunha e Maria.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro, pela orientação prestada neste trabalho, amizade e incentivo desde o início do nosso treinamento científico.

Aos meus amigos Carlos Alberto Flores, Jamil Assreuy Filho, Marco Aurélio Martins, Ana Maria Sampaio e Henrique Nogales Vasconcelos, que participaram na elaboração e execução deste trabalho.

Ao Prof. Luiz Recamonde Capelo, pelas valiosas sugestões quando da leitura do manuscrito.

Ao Prof. Teonas Cipriano de Carvalho pela realização dos cortes histológicos e diagnóstico dos mesmos.

Ao Prof. Livino Júnior pelo excelente trabalho microfotográfico.

Aos amigos Rosalvo Tadeu H. Fogaça, Maria do Socorro Sampaio, José Júlio Sampaio, Heraldo Oliveira Júnior, Maria Lúcia Cordeiro, Carlos Alberto Bezerra e Yacy Mendonça de Almeida pelo auxílio prestado nas diversas fases deste trabalho.

Aos Srs. Mardomio Guedes, Petronio Timo, Antônio Fernando de Oliveira e Solano Martins, pelo auxílio técnico na fase experimental do trabalho.

Ao Sr. Adriano José da Costa Sampaio, pelos excelentes serviços datilográficos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Í N D I C E
- - - - -

	Pág.
ABREVIACÕES	vii
ABSTRACT.	viii
SUMÁRIO	ix
INTRODUÇÃO.	i
MATERIAIS E MÉTODOS	11
RESULTADOS.	27
DISCUSSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	56

ABREVIACÕES

BHC	- 1,2,3,4,5,6-HEXACLOROCICLOHEXANO
BKG	- BRADICININÓGENO PLASMÁTICO
DDT	- 1,1,1-TRICLORO-2,2-BIS (PARACLOROFENIL) ETANO
IgA	- IMUNOGLOBULINA A
IgG	- IMUNOGLOBULINA G
IgM	- IMUNOGLOBULINA M
LEM	- MEDIADOR LEUCOCÍTICO ENDÓGENO
Pb	- <i>Plasmodium berghei</i>
PCPA	- p-CLOROFENILALANINA
PGA ₁	- PROSTAGLANDINA DA SÉRIE A ₁
PGE ₁	- PROSTAGLANDINA DA SÉRIE E ₁
PGF _{1α}	- PROSTAGLANDINA DA SÉRIE F _{1α}
PGF _{2α}	- PROSTAGLANDINA DA SÉRIE F _{2α}
SNC	- SISTEMA NERVOSO CENTRAL
SST	- SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA

ABSTRACT

Mice experimentally infected with *Plasmodium berghei*, demonstrated the following physiopathological alterations during seven days of malarial infection: reduction in haematocrit, increases in parasitized erythrocytes, pulmonary edema, hypothermia, formation of prostaglandin-like substances in the central nervous system, increases of plasma bradykininogen levels up to the 6th day of infection, and decrease on the 7th day; and finally leukocytosis evidenced by neutrophilia, lymphocytosis and monocytosis. Total plasma protein levels, were not altered during the course of infection.

The treatment of infected animals with some pharmacological antagonists, namely phenoxybenzamine, methysergide, p-chlorophenylalanine (PCPA) and indomethacin, inhibited formation of pulmonary edema in the last 2-3 days of infection. Although treatment with phenoxybenzamine and indomethacin potentiated malarial hypothermia on 5th, 6th and 7th days of infection, neither a serotonin receptor-blocker (methysergide) nor a serotonin synthesis inhibitor (PCPA), significantly altered the hypothermia of the infected animals.

When normal animals were injected intravenously with supernatant obtained by incubating leukocytes from infected donors (7th day of infection), they showed a significant fall in body temperature, similar to that observed in *P. berghei*-infected animals.

These results showed that:

a) The observed physiopathological alterations of mice infected with *P. berghei* have involvement of endogenous mediators namely, catecholamines, serotonin, prostaglandins and plasma kinins.

b) Together with endogenous mediators, leukocytes have participated in the generation and maintenance of these alterations.

SUMÁRIO

Usando camundongos como animais de experimentação e o *Plasmodium berghei* como agente infectante, observou-se as seguintes alterações fisiopatológicas, durante sete dias de infecção: redução do hematócrito, aumento do número de eritrócitos parasitados, edema pulmonar, hipotermia, formação de substâncias prostaglandina-símile no sistema nervoso central, níveis de bradiginógeno plasmático acima dos controles até o 6º dia e valores abaixo no 7º dia e leucocitose evidenciada por neutrofilia, linfocitose e monocitose. Além disso, nenhuma alteração nos níveis de proteínas plasmáticas totais foi observada.

O tratamento dos animais infectados com vários antagonistas farmacológicos, tais como fenoxibenzamina, metisergida, p-clorofenilalanina (PCPA) e indometacina, inibiu a formação do edema pulmonar na fase final da infecção. Embora o tratamento dos animais com fenoxibenzamina e indometacina tenha potenciado a hipotermia malárica nos 5º, 6º e 7º dias, os inibidores de serotonina, quer de seus receptores (metisergida) ou de sua síntese (PCPA), não alteraram significativamente a hipotermia dos animais infectados.

Injeções endovenosas do sobrenadante obtido pela incubação de leucócitos provenientes de animais infectados (7º dia de infecção) em animais normais, provocaram queda da temperatura corporal destes animais, semelhante a que ocorreu em animais infectados com *P. berghei*.

Estes dados demonstraram que:

- a) - As alterações fisiopatológicas observadas em camundongos infectados com *Plasmodium berghei*, têm participação de catecolaminas, serotonina, prostaglandinas e cininas;
- b) - Além destes mediadores, os leucócitos participam na gênese e manutenção destas alterações.

INTRODUÇÃO

As investigações sobre doenças tropicais envolvem a cada dia maior número de pesquisadores das diferentes áreas do conhecimento, na tentativa de melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos destas doenças que atingem milhões de indivíduos no mundo todo.

Em relação a malária, Cohen, 1979, afirmou que, embora as campanhas de erradicação baseadas na extinção do vetor e na terapia profilática tenham obtido sucesso em partes da Europa, Ásia e América do Norte, ainda há quase um terço da população do mundo, distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, expostas ao risco da infecção.

Existem estimativas de ocorrência de 150 milhões de casos de malária por ano no mundo, e, somente na África, a mortalidade anual é de aproximadamente 1 milhão de indivíduos, dos quais as vítimas são principalmente crianças. Outro índice alarmante é o de que 15% dos casos clínicos registrados no continente africano são atribuídos à malária (Cohen, 1979).

Ultimamente, o ressurgimento da doença em áreas da Ásia e das Américas é um fator de alerta e deve-se, em parte, à aplicação de programas de erradicação inapropriados, que tiveram como consequência o aparecimento de vetores resistentes a inseticidas e/ou com um comportamento diferente (Cohen, 1979). Mais de vinte espécies de vetores anofelinos têm sido descritos como resistentes aos inseticidas organoclorados BHC e Dieldrin, bem como ao DDT. Como exemplo da mudança de comportamento, pode-se citar o *Anopheles albimanus*, que deixa o interior das residências após a picada, evitando assim o efeito do inseticida utilizado para dedetização (Cohen, 1979 e Fraire, 1975). Além disso, o aparecimento de cepas de parasitos de malária humana resistentes às drogas utilizadas na terapia anti-malária (Cohen, 1979; Fraire, 1975 e Spicer, 1979), complicam, ainda mais o quadro e colocam como alternativa imperiosa, o conhecimento mais aprofundado da fisiopatologia desta doença, visando um contro-

le mais efetivo sobre esta patologia.

A malária é causada pela multiplicação e parasitismo, no hospedeiro adequado, de protozoários da Classe *Sporozoa*, Ordem *Haemosporidida*, Família *Plasmodiidae*. Os vertebrados que possuem glóbulos vermelhos anucleados são parasitados pelo gênero *Plasmodium* e, aqueles com glóbulos vermelhos nucleados, pelo gênero *Haemamoeba* (Pessoa, 1974).

Hoje já se conhecem mais de 100 espécies de plasmódios que, normalmente, possuem um hospedeiro específico e parasitam uma gama enorme de vertebrados (Cohen, 1979). As espécies que parasitam o homem são: *Plasmodium vivax* - Graisi e Felletti, 1890; *P. malariae* - Laveran, 1881; *P. ovale* - Stephens, 1922 e *P. falciparum* - Wilcha, 1897 (Pessoa, 1974).

O ciclo do parasita nos vertebrados inicia-se quando mosquitos do Gênero *Anopheles* picam o hospedeiro e inoculam, juntamente com a saliva, as formas infectantes do plasmódio acumuladas em suas glândulas salivares. Estas formas infectantes, denominadas esporozoítas, uma vez inoculadas, alcançam o leito vascular mais próximo e 30 minutos após já não são encontradas no sangue circulante. Os esporozoítas penetram em células do sistema fagócito-mononuclear, nos casos de infecção de aves, e nos hepatócitos, em se tratando de mamíferos. No interior destas células multiplicam-se por processo de esquizogonia do qual resulta a formação de merozoítas. Este ciclo é conhecido como ciclo primário exoeritrocítico.

Dentro de sete a dez dias, dependendo da espécie de plasmódio envolvido, ocorre a ruptura da membrana celular do hepatócito liberando os merozoítas que caem na corrente sanguínea e invadem as hemácias, iniciando-se assim o ciclo eritrocítico, ou então, infectam novamente as células teciduais. Uma exceção à este ciclo é o *Plasmodium falciparum*, que não repete a fase tecidual.

Na fase eritrocítica, os merozoítas iniciam uma série de ciclos reprodutivos que se repetem, cujo período é característico para cada espécie de plasmódio. O final de cada ciclo

corresponde, geralmente, a um acesso febril no hospedeiro vertebrado. (Pessoa, 1974; Hall, 1977).

No interior das hemácias o merozoíta transforma-se em trofozoíta, cujo crescimento e maturação se fazem às custas dos constituintes da célula parasitada. O trofozoíta é capaz de metabolizar a hemoglobina em globina, que é utilizada como fonte de nutrientes, e, no grupamento heme, que irá originar a hemozoína ou pigmento malárico.

Terminado seu crescimento, o trofozoíta, pelo processo de esquizogonia, transforma-se em esquizonte e este, finalmente, em merozoíta. Neste estágio ocorre a ruptura da hemácia, liberando os merozoítas na fase aquosa do sangue, os quais vão infectar novas hemácias, iniciando-se assim um novo ciclo.

Após alguns ciclos eritrocíticos aparecem algumas formas que não mais se reproduzem assexuadamente, os gametócitos, com morfologia própria e que garantem a continuidade da espécie. O gametócito masculino ou microgametócito, e o feminino ou macrogametócito, permanecem na corrente sanguínea até que sejam sugados pelo hospedeiro hematófago invertebrado.

Após a ingestão de sangue infectado pelo anofelino, inicia-se um ciclo sexuado. No estômago do mosquito os elementos figurados são digeridos liberando os gametócitos, bem como outras formas evolutivas do parasita, as quais sofrem processos de degeneração.

Ainda no estômago do inseto ocorre a fusão do microgametócito com o macrogametócito formando o zigoto, chamado de oocineto por possuir movimentos amebóides.

O oocineto atravessa o revestimento epitelial da parede do estômago, alojando-se entre o epitélio e a membrana basal, ou mesmo no próprio epitélio. Aí segrega um envoltório protetor transformando-se em oocisto. Inicia-se, então, o processo de multiplicação esporogônica que resulta na produção de milhares de elementos filhos, os esporozoítas. Finalmente o oocisto rompe-se liberando na cavidade geral do mosquito ou hemocele os es

porozoítas, os quais se movem penetrando em todos os órgãos do mosquito. Muitos deles penetram nas glândulas salivares e alojam-se nos ductos, podendo então, serem inoculados novamente no hospedeiro vertebrado, dando início a uma nova série de ciclos assexuados (Pessoa, 1974).

As principais espécies transmissoras da malária humana existentes no Brasil são: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* - Root, 1926; *A. (Nyssorhynchus) albitarsis* - Arribalzaga, 1878 e *A. (Nyssorhynchus) aquasalis* - Curry, 1932 (Pessoa, 1974).

No presente trabalho, foi utilizado o *Plasmodium berghei* (Vincke e Lips, 1948). Esta espécie parasita roedores e, na natureza, é transmitida, principalmente, pelos anofelinos das espécies *A. dureni*, *A. quadrimaculatus*, *A. stephensis* e *A. gambiae* (Bastardo e Peraza, 1980).

No hospedeiro vertebrado, o ciclo de vida do plasmódio irá determinar inúmeras alterações decorrentes da interação parasito-hospedeiro. Hall, em 1977, relatou que na infecção malárica humana ocorrem algumas modificações nas células vermelhas do sangue, as quais são seguidas de alterações fisiopatológicas, tendo como conseqüências, lesões em vários órgãos e sistemas. Entre estas modificações das hemácias são citadas: diminuição da deformabilidade, aumento da adesividade e da fragilidade, liberação de antígenos e, possivelmente, de uma toxina e redução do transporte de oxigênio.

O aumento da fragilidade das hemácias, aliado à participação do sistema complemento, provocaria, segundo Hall, 1977, hemólise com liberação de hemoglobina na corrente sanguínea. Este quadro conduziria à hemoglobinúria malárica e/ou a precipitação de hemoglobina nos túbulos renais que contribuiria, parcialmente, para os danos tubulares. Este mesmo autor descreveu outro fator que leva ao aparecimento de lesões renais, que se caracterizam pela deposição de imunocomplexos na membrana basal glomerular.

Hepatoesplenomegalia é um achado comum do exame físico em pacientes com infecções maláricas. O fígado apresenta seus sinusóides congestionados, repletos de elementos figurados e as

células de Kupffer apresentam aumento de volume com pigmentos maláricos no seu interior. O baço apresenta-se com grandes quantidades de hemácias parasitadas e pigmentos no seu interior.

Tosta, 1976 e Hall, 1977, descreveram que durante infecções maláricas o sistema fagócito-mononuclear é intensamente estimulado, destruindo hemácias parasitadas bem como as não parasitadas, o que contribuiria para a intensa anemia observada.

O enrijecimento das hemácias e o aumento de sua adesividade são eventos que poderiam conduzir à obstrução de pequenos vasos, fatos estes, que somados à diminuição da quantidade de oxigênio transportado, determinariam anóxia tecidual.

Em 1951, Maegraith e colaboradores, trabalhando com macacos Rhesus infectados com *Plasmodium knowlesi*, relataram que as lesões hepáticas observadas foram devidas a alterações da irrigação sanguínea do fígado.

Bergin, 1967 e Brooks e colaboradores, 1968, descreveram edema pulmonar em humanos infectados com *Plasmodium falciparum*.

Hall, 1977, observou em casos de malária humana, a presença de edema em várias partes do organismo, como pulmão, cérebro e miocárdio, durante o desenvolvimento da doença. No pulmão foi encontrado um infiltrado de células mononucleares no septo alveolar, tendo sido postulado que a causa do edema estaria relacionada apenas com a diminuição da pressão oncótica do plasma, uma vez que os níveis de albumina encontravam-se baixos durante a infecção, em função, provavelmente, da redução de sua síntese hepática. Outro achado comum na infecção malárica é a hipotensão ortostática, provavelmente, em função da diminuição da resistência periférica total (Hall, 1977).

Neva e colaboradores, em 1970, descreveram que, em infecções maláricas em humanos, a participação do sistema imunológico é evidente. Os níveis séricos de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA encontravam-se elevados, sendo que o aumento total das imunoglobulinas chegou a 357% acima dos controles. Os níveis de complemento circulante apresentavam-se baixos, indicando, prova

velmente, ativação desse sistema durante o desenvolvimento da doença. Hall, 1977, apontou como provável fator responsável pelo início da coagulação intravascular disseminada observada em infecções maláricas, a ativação do sistema complemento.

Neva e colaboradores, 1970, sugeriram a participação de fatores de imunidade celular na malária, o que foi mais tarde confirmado por Cohen, em 1979. Estes mesmos autores reportaram que soldados que foram do Vietnã para os EUA e que se encontravam infectados com *Plasmodium falciparum*, apresentavam edema pulmonar com hemorragia intra-alveolar e formação de membrana hialina. Não existiam sinais de falência cardíaca, pois nestes pacientes o coração apresentava-se com tamanho e batimentos normais.

Brooks e colaboradores, em 1967, não encontraram correlação entre os edemas facial e periorbital encontrados em pacientes maláricos, com disfunção renal ou mesmo com hipoproteïnemia. Segundo estes autores os edemas estariam correlacionados com o aumento da permeabilidade vascular e retenção de líquido nestes locais.

Boonpucknavig e Sitprija, 1979, relataram que um dos eventos mais importantes da malária provocada por *Plasmodium falciparum* é o aumento da permeabilidade vascular.

Tella e Maegraith mostraram, em 1966, que Macaca mulatta infectados com *Plasmodium knowlesi* apresentavam níveis de calicreína, enzima que cinde o bradicinógeno liberando bradicinina, elevados em relação aos animais controles. Neste mesmo trabalho, os autores postularam que a estase observada em pequenos vasos cerebrais de animais maláricos seria devida a um aumento da permeabilidade vascular, de maneira semelhante àquela que ocorre em processos inflamatórios. Migasena e Maegraith, em 1967, demonstraram a passagem de albumina e água para o líquido cefaloraquidiano de macacos e camundongos infectados com *P. knowlesi* e *P. berghei*, respectivamente.

Onabanjo e Maegraith, em 1970, demonstraram aumento nas concentrações de adenosina e histamina na corrente sanguínea de

macacos infectados com *P. knowlesi*.

Goodwin e Richards em 1960, trabalhando com camundongos infectados com *Babesia rodhaini*, *Tripanossoma brucei* e *Plasmodium berghei*, demonstraram a presença de polipeptídeos farmacologicamente ativos, cinina-símbles, na urina destes animais.

Em 1972, Ohtomo e Katori demonstraram em camundongos infectados com *P. berghei*, cuja parasitemia era superior a 30%, uma queda significativa nos níveis de bradicinógeno plasmático além de hipotensão arterial.

Weiss, em 1978, descreveu que os pulmões de camundongos infectados com *P. berghei* apresentavam-se edematosos com presença de imunocomplexos, positivos para imunoglobulina, C3 e antígenos maláricos.

Skirrow e colaboradores, 1965, demonstraram que *Macaca mulata* infectada com *Plasmodium knowlesi* apresentava hiperatividade do sistema nervoso simpático.

Rothschild e colaboradores, 1975, demonstraram que a injeção endovenosa de adrenalina em ratos provocou edema pulmonar, o qual tem componente cinínico, uma vez que concomitantemente ao edema ocorreu consumo do bradicinógeno plasmático. Esses mesmos autores já haviam demonstrado, em 1974, que o consumo de bradicinógeno plasmático evocado pela adrenalina, tanto "in vivo" como "in vitro", dependia da presença de leucócitos, mais especificamente de neutrófilos e/ou basófilos.

Os dados da literatura com relação ao comportamento do leucograma em infecções maláricas nas diversas espécies animais ainda são bastante controversos. Cannon, 1941, observou em malária humana causada por *Plasmodium falciparum*, leucopenia acompanhada de linfocitose relativa. Brooks e colaboradores, 1968, não encontraram alterações do número de leucócitos, mas Falconer, 1919, e Rigdon, 1942, encontraram leucocitose em casos de malária humana.

A participação de serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas no aumento da permeabilidade e extravasamento de

líquido e células é bem conhecida (Hurley, 1978).

A liberação de prostaglandinas da série E, por ação da bradicinina, foi demonstrada por Colina-Chourio e colaboradores, 1976, quando perfundiam o rim de coelho com bradicinina e/ou brad₂icininógeno.

A literatura relacionada com os mecanismos envolvidos na alteração da temperatura corporal e na patogênese da febre, aumentou intensamente na última década. Entre as várias revisões envolvendo estes assuntos, podem ser citadas as de Feldberg, 1975, Hellon, 1975, Milton, 1976 e Feldberg e Milton, 1978.

Os agentes que invadem os organismos e que apresentam capacidade de produzir alterações na temperatura interna corporal, são chamados de pirógenos exógenos (Hellon, 1975 e Milton, 1976). Como exemplo, podem ser citadas as bactérias gram-positivas e gram-negativas, micobactérias, vírus, fungos, protozoários, etc.

Após fagocitarem os pirógenos exógenos, as células de defesa liberam na corrente sanguínea, uma proteína conhecida como pirógeno endógeno. Todas as células que fagocitam têm capacidade de liberar pirógenos endógenos (Milton, 1976).

Os pirógenos endógenos, provavelmente, atravessam a barreira hematoencefálica e agem no hipotálamo anterior. Milton, 1976, relatou que injeções de PGE₁ nos ventrículos cerebrais de gatos, cães e coelhos, provocaram aumento da temperatura corporal, e que durante a febre provocada por pirógenos, o nível de PGE₁ no líquido cefaloraquidiano, encontrava-se elevado. O mesmo autor descreveu também, que o aumento da concentração de PGE₁ juntamente com a febre, foram abolidos quando os animais foram tratados com drogas antipiréticas.

Baseados nestas evidências, os autores concluíram que, no hipotálamo anterior, os pirógenos endógenos liberariam prostaglandinas, as quais seriam os mediadores responsáveis pela febre.

Por outro lado, tem sido demonstrada a participação de

aminas biogênicas e de outros mediadores químicos em núcleos do hipotálamo, envolvidos no controle da temperatura corporal. Administrações intracerebrais destas substâncias provocam variações na temperatura corporal. Estas variações são dependentes da dose e da espécie, bem como da temperatura ambiente (Hellon, 1975).

Os dados da literatura com relação à alteração de temperatura em ratos e camundongos após injeções de aminas biogênicas são bastante controversos.

Segundo Hellon, 1975 e Brittain e Handley, 1967, noradrenalina e serotonina injetadas nos ventrículos cerebrais de camundongos, a uma temperatura ambiente abaixo de 25°C, provocaram hipotermia. Entretanto, adrenalina promoveu uma resposta bifásica e a isoprenalina apenas hipertemia (Brittain e Handley, 1967). Hellon, 1975, descreveu também, que a hipotermia provocada pela noradrenalina pôde ser revertida em hipertemia, quando a temperatura ambiente era elevada para 35°C.

Em ratos, esse mesmo autor demonstrou que injeções de serotonina nos ventrículos cerebrais, provocaram hipotermia, enquanto que as de noradrenalina produziram hipertermia. Entretanto, Bugajski e colaboradores, 1980, relataram que o efeito hipertérmico da noradrenalina só ocorreu em baixas doses, visto que em altas doses a resposta observada foi bifásica.

Dopamina injetada nos ventrículos cerebrais de ratos provocou, também, resposta hipotérmica (Cox e colaboradores, 1980).

Hellon, 1975, demonstrou que injeções de histamina nos ventrículos cerebrais de camundongos provocaram hipotermia.

Estas observações tomadas em conjunto indicam que algumas das alterações fisiopatológicas que ocorrem na malária assemelham-se a um quadro 'inflamatório agudo. Dentro destas perspectivas e utilizando camundongos como animais de experimentação e o *Plasmodium berghei* como agente infectante, são objetivos deste trabalho:

- a) Analisar o comportamento da parasitemia e hematócrito dos animais, como índice de desenvolvimento da

doença;

- b) Caracterizar a existência de edema pulmonar em camundongos submetidos a essa condição experimental;
- c) Correlacionar a sua gênese com a instalação de um quadro inflamatório (liberação de mediadores inflamatórios e participação celular);
- d) Analisar as alterações de temperatura corporal, relacionando-as aos mecanismos envolvidos na produção e manutenção dessas alterações.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Os animais utilizados foram camundongos Swiss-44 machos, pesando entre 18 e 25 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de Brasília e também, pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Durante a realização dos experimentos, os animais foram mantidos em caixas com, no máximo, 25 animais, com livre acesso a água e alimentos.

As condições ambientais dos grupos infectados foram idênticas àquelas do grupo controle.

2. AGENTE INFECTANTE

O agente infectante utilizado foi o *Plasmodium berghei* (Vincke e Lips, 1948), cepa proveniente do Instituto Pasteur de Paris, que vem sendo mantida há mais de 30 anos no Instituto Osvaldo Cruz do Rio de Janeiro e, posteriormente, na Universidade de Brasília. Atualmente, vem sendo mantida, também, no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

A manutenção da cepa de *Plasmodium berghei* (Pb) ou a infecção de grupos experimentais, foi feita colhendo-se sangue por punção cardíaca de animais que apresentavam parasitemia superior a 40%, contada em esfregaço de sangue. A seguir, cada animal recebeu 0,2 ml da solução de sangue diluído em salina fisiológica, por via intraperitoneal, contendo aproximadamente 5×10^6 eritrócitos parasitados.

Ao final de sete dias os animais infectados morreram,

devido à infecção. Cada parâmetro foi analisado diariamente, até o último dia de infecção.

3. PARASITEMIA

A parasitemia foi determinada através de um pequeno corte na extremidade da cauda do animal, para a obtenção de uma gota de sangue, com a qual foi feita um esfregaço para contagem de hemácias parasitadas. Os esfregaços foram fixados com metanol durante 2 a 3 minutos, corados pelo método de Giemsa e examinados sob objetiva de imersão.

Foram contadas de 500 a 1000 hemácias em, pelo menos, cinco campos diferentes, expressando-se em percentagem o número de hemácias parasitadas, segundo a relação abaixo:

$$\frac{\text{Número de hemácias parasitadas}}{\text{Número de hemácias totais}} \times 100 = \text{Percentagem de hemácias parasitadas}$$

4. HEMATÓCRITO

O hematócrito foi feito através de microtécnica.

Após pequeno corte na ponta da cauda do animal, o sangue foi colhido por capilaridade em tubos capilares heparinizados (Cat. nº 21112 - Sherwood), os quais foram fechados em uma das extremidades por material plástico Critoseal (Recorder nº 8889215003 - Sherwood), e centrifugados durante 15 minutos a 15 000 G, à temperatura ambiente.

Utilizou-se uma régua graduada em milímetros para medição do comprimento total da coluna de sangue e do comprimento da coluna de elementos figurados. O hematócrito foi calculado e expresso em percentagem através da relação:

$$\frac{\text{Comprimento (mm) da coluna de elementos figurados}}{\text{Comprimento (mm) da coluna total}} \times 100 = \text{hematócrito}$$

5. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS

As proteínas plasmáticas totais foram determinadas pelo método do biureto (Reinhold, 1953). O sangue foi retirado por punção cardíaca, em seringa siliconizada contendo 10% do volume de oxalato de sódio a 1%, e centrifugado a 1.200 G durante 10 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,1 ml de plasma foi diluído em salina fisiológica para um volume final de 1 ml, ao qual foram adicionados 4 ml do reagente de biureto. Os tubos, preparados desta maneira, foram deixados à temperatura ambiente durante 15 minutos e a seguir, determinadas suas densidades ópticas em um espectrofotômetro Zeiss, a um comprimento de onda de 540 nm. No tubo "branco", o volume correspondente ao plasma foi substituído por salina fisiológica. A curva padrão foi realizada utilizando-se, em lugar do plasma, soluções contendo concentrações crescentes de albumina sérica bovina, cristalina, de 1, 2, 4, 8 e 16 mg/ml de salina a 0,9%.

6. BRADICININÓGENO PLASMÁTICO

Para a quantificação do bradicininógeno plasmático, utilizou-se a técnica de Diniz e Carvalho, 1963, com modificações introduzidas pelo Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ribeirão Preto, USP.

Através de seringa siliconizada contendo 0,1 ml de oxalato de sódio a 1%, foi retirado 1 ml de sangue por punção cardíaca, transferido para tubos de polietileno e centrifugado, posteriormente, a 1 200 G durante 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, 0,2 ml do plasma foi transferido por intermédio de uma pipeta siliconizada para outro tubo de polietileno, contendo 1,8 ml de ácido acético a 0,2% (V/V). Após este procedimento, os tubos foram fervidos durante 30 minutos em água em ebulição.

Os tubos foram resfriados em água corrente, seguindo-se o processamento para dosagem biológica, ou então, armazenados em "freezer" a -20°C . Para a dosagem biológica, os tubos foram des-

congelados à temperatura ambiente e o pH foi ajustado para 7,8 com, aproximadamente, 0,06 ml de NaOH 1N. A seguir, foi adicionado 0,5 ml de tampão tris 0,2 M, pH 7,8 e acrescentado 0,1 ml de uma solução de 2 mg/ml de tripsina diluída em salina fisiológica. Os tubos foram mantidos posteriormente, durante 30 minutos, a uma temperatura de 37°C.

Em seguida à digestão triptica, o volume do tubo foi completado para 4 ml com salina a 0,9%.

A dosagem de cininas foi realizada em íleo de cobaio, intercalando-se doses da amostra com doses de solução padrão de bradicinina 1 µg/ml.

6.1. DOSAGEM BIOLÓGICA DA BRADICININA

Cobaios adultos, machos, pesando entre 200 a 300 gramas, foram sacrificados com uma pancada na nuca e exsanguinados por secção dos vasos cervicais. Após a abertura da cavidade peritoneal, foi retirado um segmento de três a cinco centímetros de íleo terminal, que foi montado em aparelho de Dale e conectado à uma alavanca de alumínio, de inscrição frontal, com ampliação de três vezes. O segmento de músculo foi mantido em uma cuba de 10 ml, banhado com solução de Tyrode a 37°C e aerado com uma bomba de aquário. Sulfato de atropina e difenidramina foram dissolvidos na solução de Tyrode para uma concentração final de 10^{-7} g/l de base livre.

O registro das contrações foi feito em papel enfumado, montado em quimógrafo.

7. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

7.1. CONTAGEM TOTAL

Para a contagem total de leucócitos, o sangue foi coletado em uma micropipeta de vidro (Herka, 25 microlitros), por

punção do plexo orbital, e diluído em solução de Türk na proporção de 1:20. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer através de microscópio óptico, com objetiva de aumento de 10 vezes. Os resultados foram expressos em números de leucócitos totais por milímetro cúbico de sangue.

7.2. CONTAGEM DIFERENCIAL

Esfregaços de sangue, para as contagens diferenciais, foram corados segundo a técnica de Giemsa.

As contagens foram feitas em microscópio óptico com objetiva de imersão. Foram contados 100 leucócitos, utilizando-se um contador de células digital marca Phoenix (Mod. EC 906 - Brasil), e o resultado, expressado em percentagens referentes aos diversos tipos de células da linhagem leucocitária.

8. DETERMINAÇÃO DO EDEMA PULMONAR

A quantificação do edema pulmonar foi realizada, utilizando-se a relação peso do pulmão (peso úmido)/peso corporal (Staub, 1974). Para isto, os animais, após pesados, foram anestesiados com éter etílico e em seguida exsanguinados, seccionando-se os vasos cervicais, e aberta a cavidade torácica. Os pulmões foram retirados, lavados rapidamente em salina a 0,9% e colocados sobre papel de filtro para retirar o excesso de umidade. Em seguida, foram pesados em balança analítica.

Realizaram-se também cortes histológicos dos pulmões dos animais, no sétimo dia de infecção, com a finalidade de evidenciar, microscopicamente, as alterações teciduais encontradas no edema pulmonar malárico.

Para tanto, os pulmões foram fixados em formol a 10% (V/V), durante 48 horas e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram obtidos através de micrótomo, para preparados em pa

rafina, com espessura de 5 micra e corados com Hematoxilina-eosina. A seguir, foram examinados em microscópio óptico e fotografados, utilizando-se conjunto para microfotografia, modelo Carl Zeiss - Jena, com objetivas de 10x e 40x.

9. TEMPERATURA CORPORAL

A temperatura corporal foi avaliada medindo-se a temperatura retal dos animais, através de um termistor (teletermômetro NE - X - Ribeirão Preto - SP), inserindo-se a ponta da sonda, que foi vaselinada para facilitar a penetração e evitar lesões, 2 a 3 cm no ânus dos camundongos (Bodel e Miller, 1976).

Após a inserção, aguardaram-se 30 a 45 segundos para estabilização da leitura.

As mensurações foram realizadas em ambientes com temperaturas variando entre 23 a 24°C, utilizando-se para isto, sala com ar condicionado.

10. FORMAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PROSTAGLANDINA-SÍMILE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

A determinação de substâncias prostaglandina-símile no SNC foi feita realizando-se a técnica proposta inicialmente por Gilmore e colaboradores, 1968, com adaptações introduzidas em nosso laboratório.

Os animais foram anestesiados com éter etílico, exsanguinados através de secção dos vasos cervicais e, imediatamente após, a calota craniana foi removida com auxílio de pequenos alicates de unha, e os cérebros retirados.

Os cérebros, em número de cinco, foram pesados e colocados em um tubo de ensaio contendo 9 ml de solução de Krebs acidificada com 0,45ml de HCl 5,75 N. A esta solução foram adicionados também, 2,0 µg/ml de indometacina (Eisen e Walker, 1976) pa

ra evitar uma possível formação de prostaglandinas, durante a realização do método.

À seguir, através de um homogenizador Potter, o conjunto de cérebros foi homogeneizado. O homogeneizado assim obtido foi, então, centrifugado a 5 000 G durante 20 minutos à temperatura ambiente, e desprezado o precipitado.

Ao sobrenadante, foi adicionado igual volume de acetato de etila, e agitado o tubo, vigorosamente, através de um agitador Vortex.

Após pequeno intervalo de tempo, formaram-se duas fases, que foram separadas para tubos diferentes, utilizando-se funis de separação.

À fase inferior (fase aquosa) foi adicionado, novamente, igual volume de acetato de etila, procedendo-se então, da maneira descrita acima. Após este procedimento, a fase aquosa foi desprezada.

As duas fases orgânicas onde se encontravam a substância prostaglandina-símile, foram juntadas e secadas em um "Flash Evaporator", à temperatura ambiente.

O material seco foi armazenado em "freezer" a -20°C até o dia da dosagem biológica.

Para a dosagem, o material foi diluído em 0,1ml de etanol, acrescentando-se após, 4,9ml de solução de Krebs.

As substâncias prostaglandina-símile foram quantificadas em órgãos isolados pela técnica de superfusão em cascata, intercalando-se doses do desconhecido com doses de prostaglandina E_2 (PGE_2). Esta técnica forneceu um recobro de aproximadamente 76%.

10.1. TÉCNICA DA SUPERFUSÃO EM CASCATA (Vane, 1964)

Foram superfundidos com solução de Krebs a 37°C contendo diversos inibidores, 2 ou 3 órgãos em cascata com um fluxo constante de 2 ml/minuto.

A solução de Krebs foi aquecida até 37°C , fazendo-a circular em uma jaqueta d'água a 37°C .

Os órgãos utilizados foram estômago de rato, cólon de rato e reto de pinto, e suas contrações registradas em um polígrafo H. Packard, modelo 7754 B.

10.2. PREPARAÇÃO DOS ÓRGÃOS ISOLADOS UTILIZADOS NA SUPERFUSÃO EM CASCATA

A) Estômago e Cólon de rato

Ratos machos, pesando entre 250 a 350 g, foram sacrificados com uma pancada na nuca e exsanguinados pela secção dos vasos cervicais. Aberto o abdômem, foi retirado o estômago e aproveitada, somente, a porção fúndica. Esta porção foi cortada em espiral, obtendo-se uma tira de 3 a 4 centímetros de comprimento e 0,5 a 1 centímetro de largura, a qual foi amarrada e adaptada ao sistema de cascata.

Do mesmo animal foi retirado o cólon, o qual foi cortado em tiras de 1 a 2 centímetros de largura e 3 a 4 centímetros de comprimento, sendo também, adaptado ao sistema.

B) Reto de pinto

Pintos de 1 a 3 dias de idade foram decapitados, e em seguida dissecados os retos, dos quais utilizaram-se apenas 2 a 3 centímetros de comprimento da parte terminal. Após lavagem com solução de Krebs, foi também adaptado ao sistema da cascata. Ao término da montagem, os órgãos foram deixados estabilizar, por um período de 15 a 30 minutos, durante o qual foram superfundidos apenas com solução de Krebs.

11. PRODUÇÃO DE MEDIADOR LEUCÓCITO ENDÓGENO (LEM),
A PARTIR DE LEUCÓCITOS, PROVENIENTES DE ANI-
MAIS INFECTADOS COM *Plasmodium berghei*

11.1. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES

Para extração de leucócitos circulantes, foi utilizada a técnica de Henson (1971), com modificações introduzidas em nos so laboratório. O sangue foi retirado de camundongos normais ou infectados, por punção cardíaca, utilizando-se uma seringa siliconizada, contendo 10% do volume de sangue a ser retirado, de oxalato de sódio a 1%(p/v). O sangue foi centrifugado a 550 G, por 20 minutos à temperatura ambiente, em tubos siliconizados. Com uma pipeta Pasteur siliconizada, removeu-se o plasma e o creme leucocitário que contém a maioria das células mononucleares. Ao creme leucocitário foram adicionados 5 a 10 ml de salina fisiológica que, após homogeneização, foi centrifugado a 550 G por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este procedimento, o sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram adicionados 7,0 ml de cloreto de amônio (NH_4Cl) diluído a 0,83% (p/v), pH 7,2, para a lise dos eritrócitos restantes. Depois de 5 minutos em banho-maria a 37°C, a amostra foi centrifugada a 400 G por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o processo de lise foi repetido. Após nova centrifugação, o sedimento foi lavado por duas vezes com solução salina tamponada (SST). A seguir, os leucócitos foram ressuspensos em SST (1 - 2 ml) e mantidos a 4°C.

Após a retirada do creme leucocitário e do plasma, o tubo com hemácias e leucócitos remanescentes, foi enchido com gelatina a 2,5%(p/v) diluída em SST estéril, em quantidade igual ao plasma retirado na primeira fase, homogeneizado e colocado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após este intervalo de tempo, as hemácias sedimentaram-se e o sobrenadante, rico em leucócitos, foi retirado e centrifugado a 400 G por 10 minutos à temperatura ambiente, para prevenir a solidificação da gelatina. Em seguida,

o sobrenadante foi desprezado e ao sedimento, adicionados 7,0 ml de cloreto de amônio 0,83%, pH 7,2 e, posteriormente, incubado durante 5 minutos em banho-maria a 37°C. A amostra foi então centrifugada a 300 G por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento por duas vezes com SST. Os leucócitos foram ressuspensos em 0,5 a 1,0 ml de SST e em seguida, misturados com os obtidos a partir do creme leucocitário.

Esta técnica fornece um recobro de aproximadamente 90% dos leucócitos circulantes, com viabilidade de mais de 95%, quando verificada por exclusão de eosina Y a 1% em salina fisiológica.

11.2. PRODUÇÃO DO MEDIADOR LEUCOCÍTICO ENDÓGENO (LEM)

Todo o material utilizado, tanto na produção de LEM como na obtenção de leucócitos periféricos, foi siliconizado e autoclavado, a 120°C, durante 30 minutos. A suspensão de leucócitos proveniente de animais normais ou infectados, teve sua concentração ajustada com SST para que, em cada 0,1 ml da suspensão final, existissem 10^5 ou 10^6 leucócitos. A seguir, os tubos foram incubados em agitador Dubnoff a 37°C por 3 horas. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 600 G por 10 minutos à temperatura ambiente.

11.3. INJEÇÃO DO "LEM" EM ANIMAIS NORMAIS

Camundongos normais tiveram sua temperatura retal medida, a uma temperatura ambiente entre 23°C e 24°C. A seguir, cada grupo de animais recebeu, via plexo orbital, sobrenadantes da incubação de leucócitos provenientes de animais infectados com *P. berghei* (LEM) e de animais normais, nas concentrações mencionadas anteriormente (10^5 ou 10^6 células). O volume de injeção foi sempre de 0,1 ml, e os animais controle, receberam o mesmo volu-

me de salina fisiológica. A temperatura retal de cada grupo foi tomada em intervalos de 30, 60, 120 e 180 minutos após a injeção do sobrenadante ou salina.

TRATAMENTOS DOS ANIMAIS COM DIVERSOS ANTAGONISTAS FARMACOLÓGICOS

Na segunda fase do trabalho trataram-se grupos de animais infectados e controles com diversas drogas, e foram analisados alguns parâmetros já descritos.

Os animais receberam injeções dos antagonistas (esquema próprio para cada droga) e foram infectados com *Plasmodium berghei* (Pb). Os parâmetros: parasitemia, edema pulmonar e temperatura, foram avaliados nos três últimos dias da infecção, ou seja, quinto, sexto e sétimo dias.

Para cada tratamento foram realizados grupos-controle, onde substituiu-se a aplicação do Pb, por injeção de salina fisiológica.

a) FENOXIBENZAMINA (α -BLOQUEADOR)

Para 1 mg de fenoxibenzamina utilizou-se 0,05 ml de etanol para sua completa diluição e o volume completado com salina fisiológica para se obter a concentração desejada. A via de administração foi a intraperitonal, sendo que os camundongos nunca receberam volume superior a 0,3 ml.

O esquema de tratamento foi o seguinte:

tempo 0 : 1mg/kg de fenoxibenzamina

1 h após: 3mg/kg de fenoxibenzamina

2 h após: 3mg/kg de fenoxibenzamina

3 h após: foi realizado a infecção com *Plasmodium berghei* e injetada salina 0,9% nos controles.

Diariamente, foi aplicada uma dose de manutenção de 3mg/kg.

b) METISERGIDA (DESERILA) - (ANTISEROTONINÉRGICO)

Deserila foi diluída em 0,1 ml de metanol e o volume necessário para se obter a concentração final desejada, foi completado com salina fisiológica.

O esquema utilizado para tratamento foi o seguinte:

tempo 0 : 1mg/kg de metisergida

1 h após : 1mg/kg de metisergida

2 h após : infecção dos animais com Pb e aplicação de salina 0,9% nos controles.

Diariamente foi injetada uma dose de manutenção de 1mg/kg.

A via de administração foi a intraperitoneal.

c) p-CLOROFENILALANINA (PCPA) - (INIBIDOR DE SÍNTESE DE SEROTONINA)

p-Clorofenilalanina foi diluída em 0,1ml de acetona e acidificada com 0,05 ml de HCl 0,5 N. Para obtenção da concentração desejada completou-se o volume com salina 0,9%.

O esquema de tratamento utilizado foi o seguinte:

Tempo 0 : 300 mg/kg de p-clorofenilalanina

24 h após : infecção dos animais com *Plasmodium berghei* e aplicação de salina nos grupos-controles.

No 49 dia de infecção os animais receberam, novamente, uma dose de manutenção de 300 mg/kg.

A via de administração foi a intraperitoneal e o volume injetado não foi superior a 0,3ml.

d) INDOMETACINA - (INIBIDOR DE SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS)

Indometacina foi diluída em tampão tris a 0,2M, pH 7,8,

obedecendo ao seguinte esquema de tratamento:

tempo 0 : 8 mg/kg de indometacina
 8 h após : 8 mg/kg de indometacina
 16 h após: 8 mg/kg de indometacina
 24 h após: 8 mg/kg de indometacina e infecção dos animais com *Plasmodium berghei* e aplicação de salina nos animais-controle.

Durante todo o período de infecção, continuou-se injetando indometacina na dose de 8mg/kg, em intervalos de 8 em 8 horas.

A via de administração da droga foi a intraperitoneal, e o volume injetado em cada animal não foi superior a 0,2 ml.

REAGENTES E SOLUÇÕES

1) Reagente de Biureto

Solução I : 180g de NaOH diluído em 450 ml de água destilada.

Solução II : 50 ml de NH_4OH (25%) diluído em 450ml de água destilada.

Solução III : 2,5 ml de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ diluído em 450ml de água destilada.

Preparação: Adicionar a solução III à solução II, com agitação. Após completa dissolução, juntar à mistura, lentamente, e com agitação, a solução, I.

2) Solução de Tyrode

	Concentração mM
Cloreto de sódio	136,8
Cloreto de potássio	2,7

	Concentração mM
Cloreto de cálcio	0,9
Cloreto de magnésio hexa- hidratado	1,1
Bicarbonato de sódio	11,9
Fosfato monobásico de sódio	0,41
Glicose	5,6

3) Solução de Krebs

	Concentração mM
Cloreto de sódio	115,50
Cloreto de potássio	10,00
Cloreto de cálcio (bi-hidra- tado)	2,09
Sulfato de magnésio (hepta- hidratado)	0,62
Bicarbonato de sódio	25,00
Fosfato monobásico de potás- sio	1,44
Glicose	7,22

À solução de Krebs preparada, foram adicionados os seguintes antagonistas:

Atropina	$3,5 \times 10^{-7}$ M	(anti-colinérgico muscarínico)
Metisergida	$5,7 \times 10^{-7}$ M	(anti-serotonínico)
Difenidramina	$3,9 \times 10^{-7}$ M	(anti-histamínico)
Fenoxibenzamina	$3,3 \times 10^{-7}$ M	(alfa-adrenérgico)
Propranolol	$7,7 \times 10^{-6}$ M	(beta-adrenérgico)

4) Preparação da solução de Türk

Foram diluídos 2 ml de ácido acético glacial em 100 ml de água destilada. Após, adicionaram-se alguns cristais de violeta genciana, cuja função foi aumentar o contraste dos leucócitos na

câmara de Neubauer.

5) Solução salina tamponada (SST)

	Concentração	mM
Cloreto de sódio	140,00	
Fosfato de sódio dibásico hidratado	2,61	
Fosfato de sódio secundário	7,40	
Água bidestilada q.s.p.		
O pH ajustado para 7,4		

DROGAS E REAGENTES

As substâncias empregadas foram, sempre que disponíveis, de grau analítico (PA ou CP).

- Acetato de etila (Merck Darmstadt e Reagen)
- Albumina sérica bovina (Sigma)
- Bradicinina (Sandoz e Penninsula)
- p-Clorofenilalanina (Sigma)
- Difenidramina ("Benadryl" Sigma)
- Eosina Y (Merck Darmstadt)
- Éter Etílico (Reagen)
- Fenoxibenzamina (Smith, Kline e French)
- Formol (40%) (Diolab)
- Gelatina (Difco)
- Giemsa (Merck Darmstadt e Reagen)
- Hematoxilina - Eosina (Merck - Darmstadt)
- Indometacina (Sigma)

- Metanol (Merck - Darmstadt)
- Metisergida (Sandoz)
- Parafina Histológica (Qeel)
- Propranolol (Sigma)
- Prostaglandina E₂ (Doação do Dr. John E. Pike, Upjohn Co., Kalamazoo, U.S.A.)
- Siliclad (Clay-Adams)
- Sulfato de Atropina (Sigma)
- Tripsina 2x Cristalizada (Worthington e Sigma)
- Tris-Hidroximetilaminometano (Sigma)
- Violeta Genciana (Merck - Darmstadt)

Os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Aos dados experimentais foram aplicados tratamentos estatísticos (Snedecor, 1963), para determinação de erro padrão (E.P.M.) da média e da significância entre grupos (teste "t" - Student).

RESULTADOS

Os efeitos da infecção malárica sobre os níveis de parasitemia, hematócrito e proteínas plasmáticas totais de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* (Pb), estão mostrados na tabela 1. A parasitemia aumentou, progressivamente, a partir do segundo dia, atingindo níveis de 60% no sétimo e último dia de infecção. O hematócrito diminuiu drasticamente durante o desenvolvimento da doença, caindo de níveis de 54% nos animais normais para valores em torno de 18% no último dia de infecção, revelando uma severa anemia. Pela técnica utilizada, não foram observadas alterações estatisticamente significantes nos níveis de proteínas plasmáticas totais durante o decorrer da doença.

Alterações percentuais nos níveis de bradicininógeno plasmático de animais infectados, em relação aos animais-controles, estão representadas na figura 1. Observou-se que os valores do bradicininógeno de animais maláricos permaneceram aumentados até o sexto dia da infecção, sendo que, no sétimo dia, os níveis encontravam-se abaixo dos controles. Nos 2º, 4º e 6º dias da infecção, observou-se uma queda relativa do bradicininógeno plasmático dos animais infectados, não significativa, em relação aos seus respectivos dias anteriores, ou seja, 1º, 3º e 5º dias. Quando se comparou a queda do 7º dia, com os valores do bradicininógeno plasmático observados no 5º dia de infecção, notou-se uma queda estatisticamente significativa ($p < 0,05$), o que representou uma redução de 64% durante os últimos dias da infecção.

Os animais infectados com *Plasmodium berghei*, apresentaram progressivo e drástico edema pulmonar, demonstrado pelo aumento na relação peso pulmonar/peso corporal, estatisticamente diferente dos animais normais, a partir do quarto dia de infecção (Figura 2). Os animais infectados não apresentaram variações significativas no peso corporal durante o desenvolvimento da doença.

Histopatologicamente, observou-se, no sétimo dia de in-

TABELA 1

Valores de parasitemia, hematócrito e proteínas plasmáticas totais de camundongos infectados com *Plasmodium berghei*, no curso de sete dias de infecção.

PERÍODO DE INFECÇÃO (DIAS)	PARASITEMIA (%)	HEMATÓCRITO (%)	PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS (g%)
0 (b)	-	55,28 ± 1,23(a) (10)	7,09 ± 0,44(a) (5)
1	-	53,05 ± 1,40 (10)	5,96 ± 0,44 (5)
2	0,71 ± 0,14(a) (10)	45,94* ± 1,32 (10)	6,81 ± 0,31 (5)
3	5,31 ± 0,96 (10)	36,36* ± 1,45 (10)	7,31 ± 0,10 (5)
4	18,35 ± 3,20 (9)	30,55* ± 1,56 (9)	6,31 ± 0,54 (5)
5	25,64 ± 4,18 (9)	22,25* ± 3,65 (9)	6,12 ± 0,31 (5)
6	39,20 ± 7,09 (7)	19,52** ± 5,91 (4)	5,77 ± 0,83 (5)
7	60,33 ± 8,95 (3)	18,13* ± 5,93 (3)	7,03 ± 0,31 (5)

(a) = Média ± EPM

EPM = Erro padrão da média

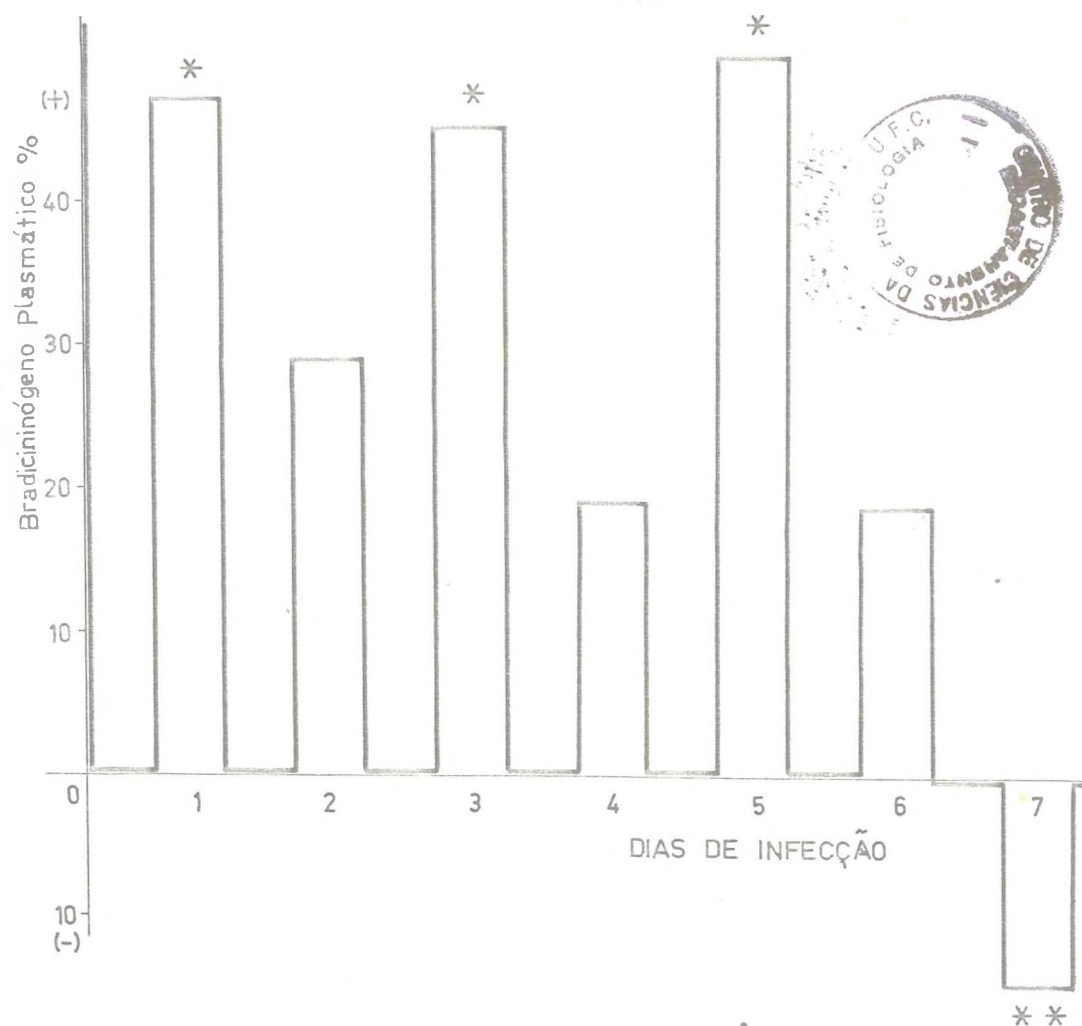
(b) = O hematócrito e as proteínas plasmáticas totais de animais normais não sofreram alterações estatisticamente significantes durante os 7 dias analisados.

() = Número de animais utilizados

* = Estatisticamente sinificante (p < 0,01)

** = Diferença de médias em relação ao grupo controle, estatisticamente sinificante (p < 0,05).

FIGURA 1



Alterações percentuais do bradycininógeno plasmático de camundongos infectados com *Plasmodium berghei*, em relação a animais normais, ao longo de sete dias após a infecção.

Cada resultado representa a média de 5 animais.

* Médias significativamente diferentes ($p < 0,05$) em relação aos animais não infectados.

** Demonstra diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) dos 5º e 7º dias de infecção.

fecção, intenso infiltrado inflamatório peri-bronquiolar, predominantemente mononuclear, representado por linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Figuras 3E e 3F). Além disso, identificou-se intenso edema pulmonar caracterizado pela nítida distensão dos alvéolos, que estavam preenchidos por material eosinofílico (devido à riqueza do edema em albumina) finamente granuloso ou homogêneo. Os septos alveolares apresentaram-se isquêmicos, restando ar em poucos alvéolos, que se mostraram, às vezes, com hiperinsuflação ou com enfisema secundário (Figuras 3B e 3D).

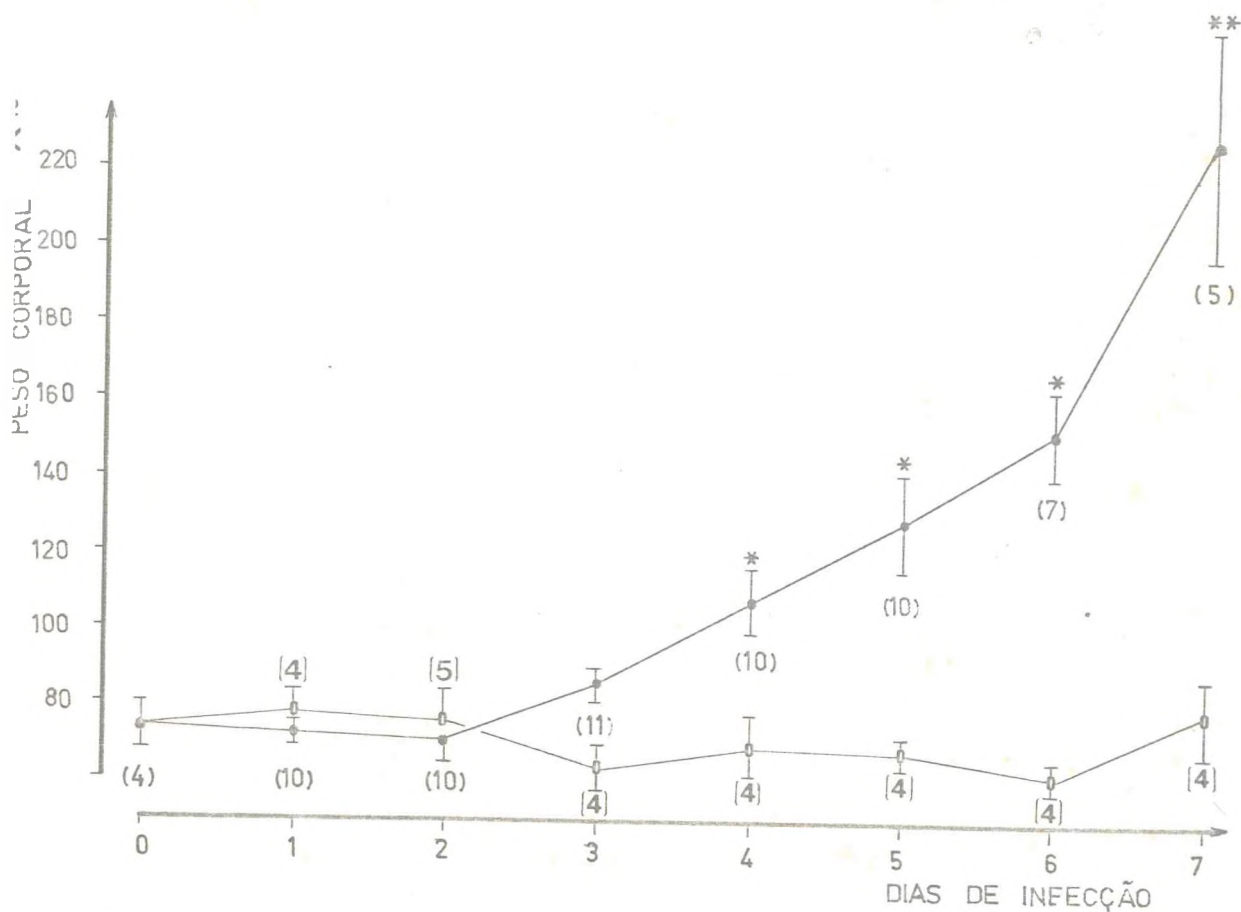
Alterações na temperatura retal dos camundongos são apresentadas na figura 4. Os animais maláricos apresentaram intensa e progressiva hipotermia no decorrer da infecção.

A infecção malárica induziu alterações nos níveis de substâncias prostaglandina-símile no sistema nervoso central dos camundongos, como pode ser observado na tabela 2. Apenas no 7º dia os níveis de substâncias prostaglandina-símile apresentaram-se aumentados, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação aos controles. Não foi observada uma relação linear entre a síntese desses ácidos graxos no sistema nervoso central e o desenvolvimento cronológico da infecção.

O comportamento dos leucócitos circulantes, durante a infecção, é observado na tabela 3. Os leucócitos totais aumentaram progressivamente com o desenvolvimento da doença, atingindo valores superiores a 20.000 células/mm³ de sangue, no estágio final da infecção. A contagem diferencial dos principais tipos da população de células brancas mostraram que, em números absolutos, todas as células (neutrófilos, linfócitos e monócitos) aumentaram de número durante o decurso da doença. Percentualmente, os neutrófilos e os monócitos aumentaram com o desenvolvimento da doença, enquanto que os linfócitos diminuíram, levando como consequência, a uma inversão do leucograma no 7º dia de infecção, onde as células predominantes passaram a ser os neutrófilos, diferentemente do grupo controle, onde predominamos linfócitos.

O efeito do tratamento dos animais infectados com diversas drogas sobre o desenvolvimento do edema pulmonar malári-

FIGURA 2



Variação da relação de Staub, considerada como medida do edema pulmonar induzido em camundongos pela infecção com *Plasmodium berghei* (●—●); Camundongos normais (○—○). As barras verticais indicam erro padrão da média (EPM), e os números entre parênteses representam o número de animais observados.

* Diferença de médias em relação ao grupo controle, estatisticamente significativa (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

FIGURA 3-A

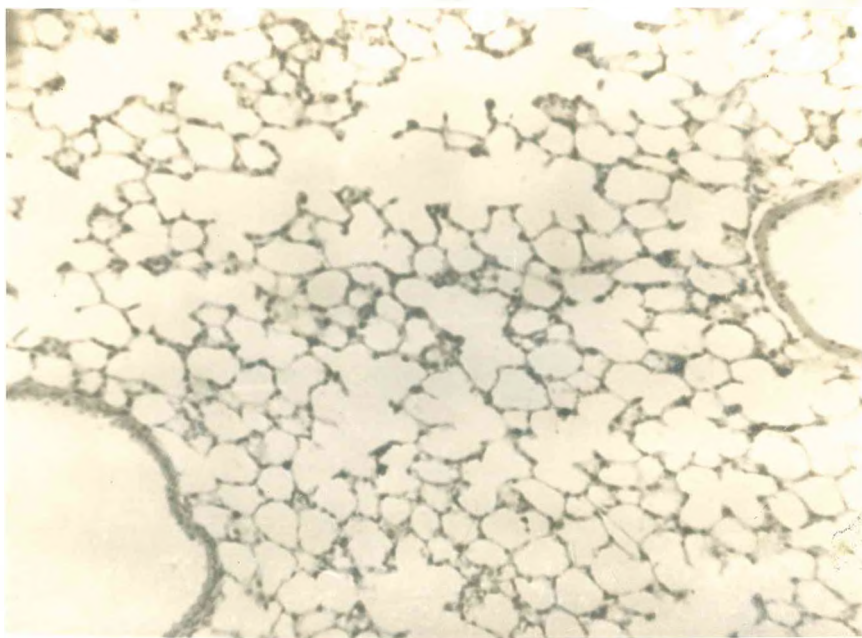


FIGURA 3-B

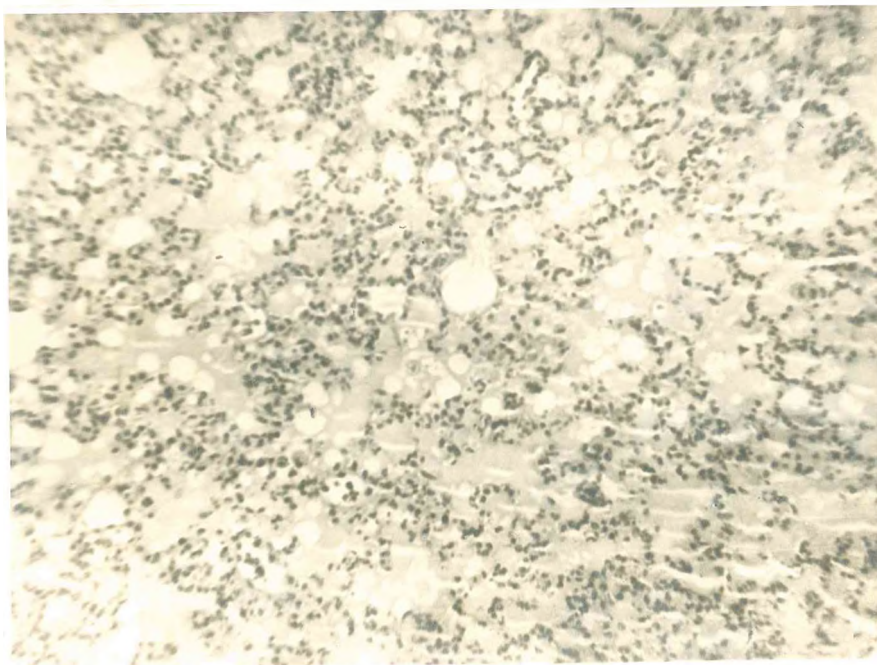


FIGURA 3-C

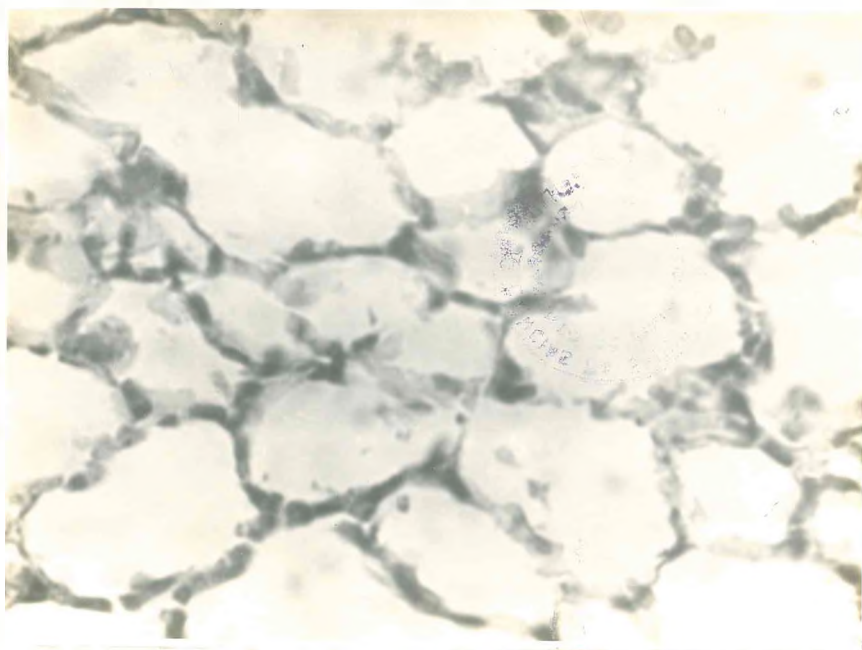


FIGURA 3-D

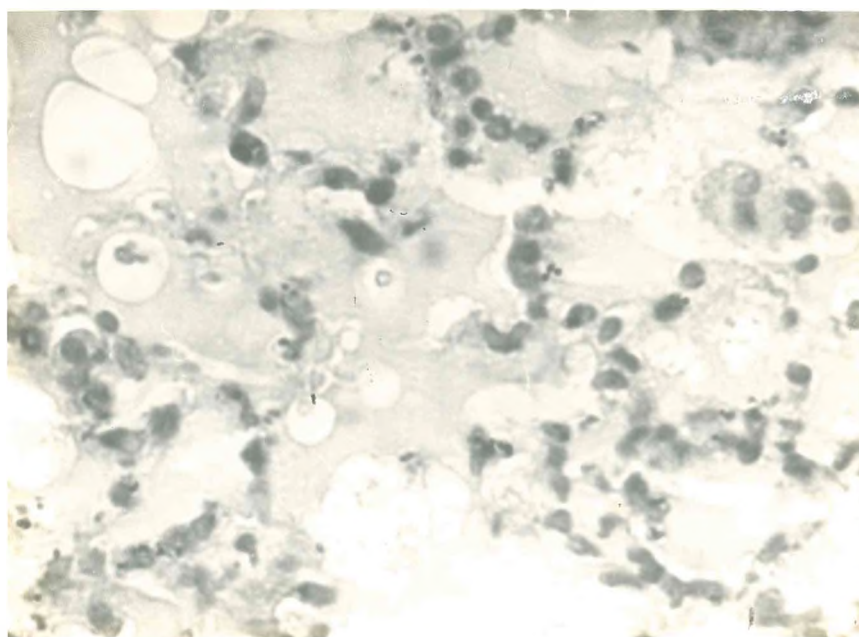


FIGURA 3-E

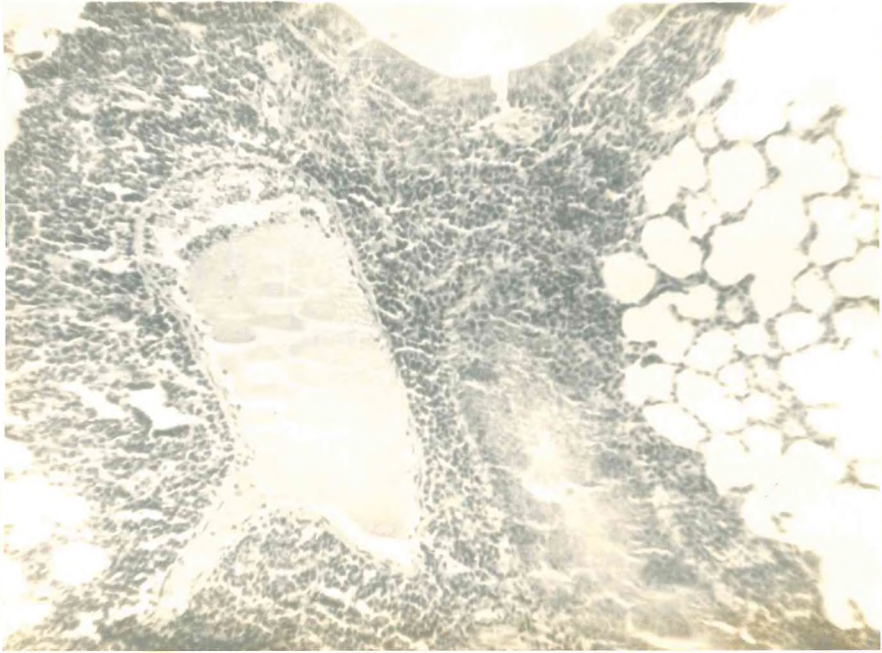


FIGURA 3-F

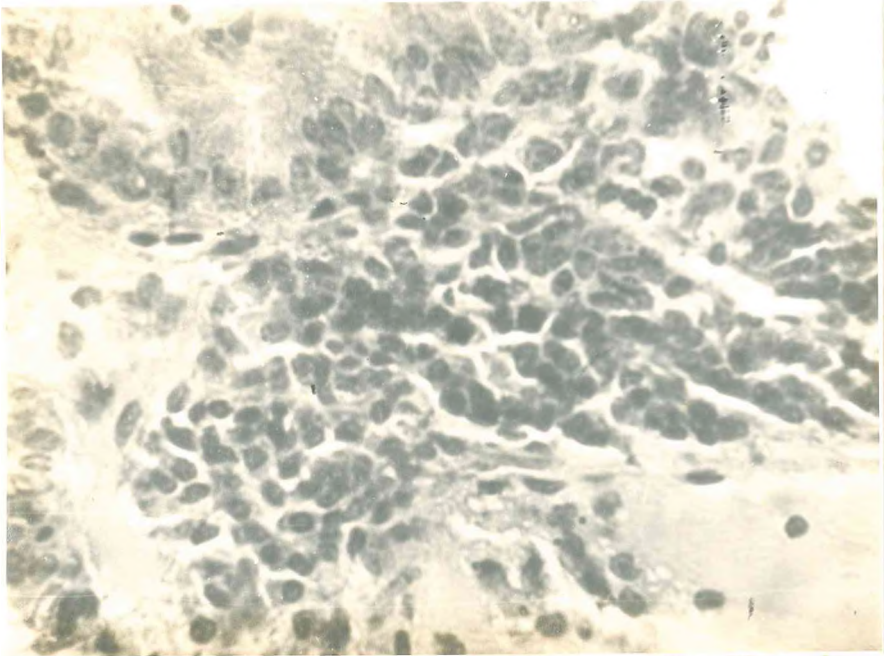


FIGURA 3

Pulmão de camundongos normais e de infectados com *Plasmodium berghei* (7º dia de infecção). Corado em Hematoxilina-Eosina.

FIGURA 3-A

Animais normais (Fotografado em microscópio Carl-Zeiss Jena com Objetiva 10 X).

FIGURA 3-B

Edema pulmonar alveolar em camundongos infectados (Fotografado em microscópio Carl-Zeiss Jena com Objetiva 10 X).

FIGURA 3-C

Animais normais (Fotografado em microscópio Carl-Zeiss Jena com objetiva 40 X).

FIGURA 3-D

Edema pulmonar alveolar em camundongos infectados (Fotografado em microscópio Carl-Zeiss Jena com objetiva 40 X).

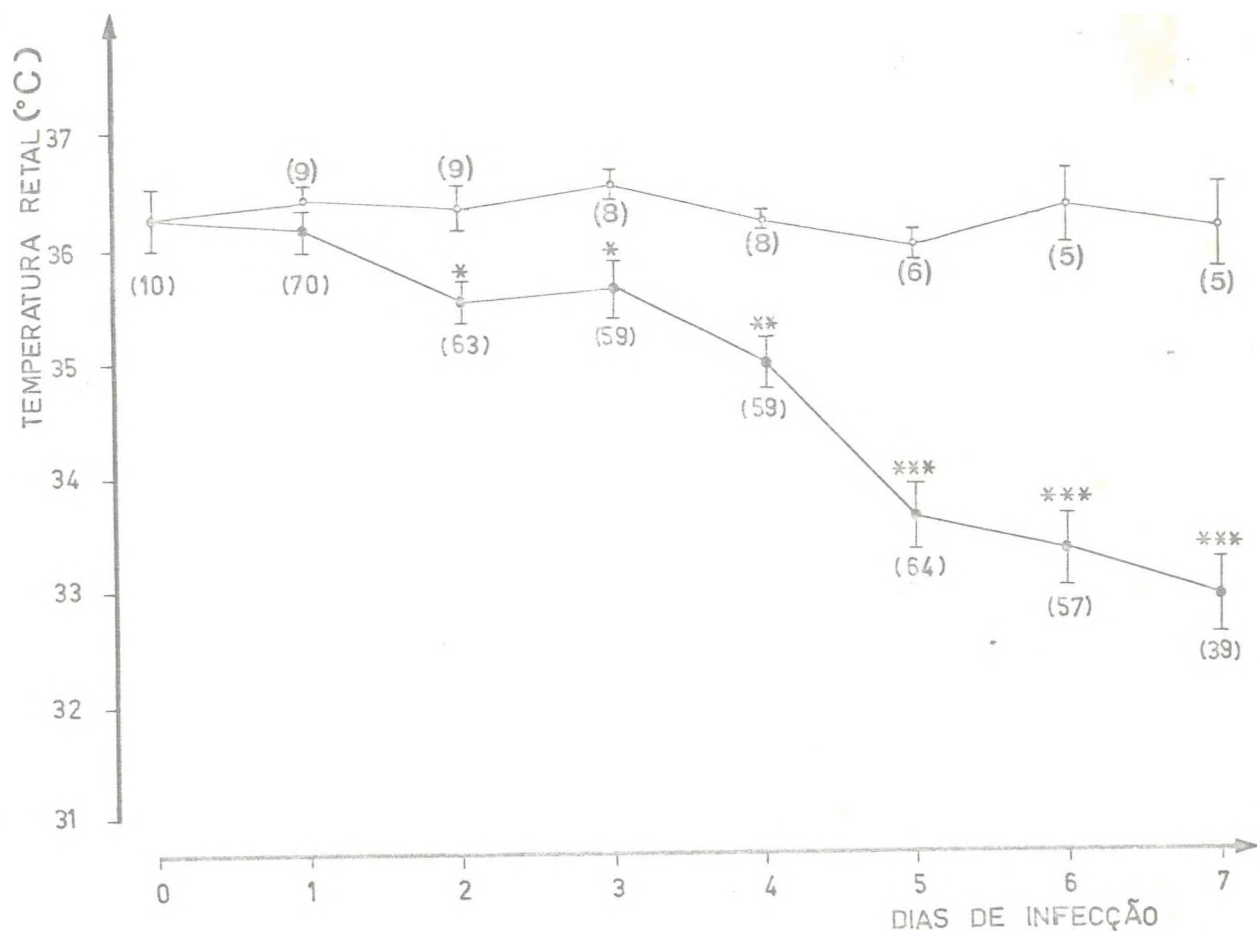
FIGURA 3-E

Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular e peribronquiolar em camundongos infectados (Fotografado em microscópio Carl-Zeiss Jena com objetiva 10 X).

FIGURA 3-F

Idem 3-E (Fotografado em microscópio Carl-Zeiss Jena com Objetiva 40 X).

FIGURA 4



Temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) de camundongos infectados com *Plasmodium berghei*, no curso de 7 dias de doença (●—●); Camundongos normais (○—○), temperatura ambiente mantida entre $24-25^{\circ}\text{C}$.

Barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM), e o número entre parênteses refere-se a quantidade de animais utilizados.

* Diferença de médias em relação ao grupo controle, estatisticamente significativa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; e *** $p < 0,001$).

TABELA 2

Concentração ($\mu\text{g/g}$ de tecido) de substância prostaglandina-símile no Sistema Nervoso Central (SNC) de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ao longo dos sete dias de infecção.

CONTROLES	DIAS DE INFECÇÃO							
	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA	6º DIA	7º DIA	
Substância Prostaglandina-símile no SNC ($\mu\text{g/g}$ de tecido cerebral; \pm EPM).	3,82 \pm 1,61 (3)	4,22 \pm 1,50 (3)	3,60 \pm 0,87 (3)	4,54 \pm 1,73 (3)	3,25 \pm 2,20 (3)	3,89 \pm 1,22 (3)	3,80 \pm 1,90 (3)	11,76* \pm 3,64 (2)
% de aumento (\uparrow) ou queda (\downarrow) em relação aos controles	-	10,47 \uparrow	5,76 \downarrow	18,85 \uparrow	14,92 \downarrow	1,83 \uparrow	0,52 \downarrow	207,85 \uparrow

Os números entre parênteses representam a quantidade de experimentos realizados. Em cada experimento utilizou-se um "pool" de 5 cérebros.

\pm EPM = \pm Erro padrão da média

* Significa que as diferenças das médias dos animais infectados em relação aos normais são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

TABELA 3

Valores médios absolutos (n°/mm^3) e relativos (%) de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos em camundongos Swiss-44, ao longo de sete dias de infecção com *Plasmodium berghei*.

DIAS DE INFECÇÃO	LEUCÓCITOS TOTAIS POR mm^3 DE SANGUE	CONTAGEM DIFERENCIAL (%)					
		NEUTRÓFILOS		LINFÓCITOS		MONÓCITOS	
Controles	5.673,07 ± 508,44	23,13 ± 2,38 (1.295,90 ± 392,13)	74,81 ± 2,67 (3.344,60 ± 379,53)	2,06 ± 0,44 (128,12 ± 50,19)			
1	6.340,00 ± 890,94	32,25 ± 2,66 (1.511,91 ± 284,77)	66,83 ± 2,72 (4.145,95 ± 814,46)	0,92 ± 0,39 (76,41 ± 33,76)			
2	7.029,16 ± 885,69	39,37 ± 3,25 (2.945,90* ± 582,86)	58,90 ± 3,56 (3.854,50 ± 390,93)	1,72 ± 0,54 (158,59 ± 70,18)			
3	7.785,71 ± 1.191,58	35,41 ± 2,89 (2.377,09 ± 409,54)	63,33 ± 2,94 (4.232,63 ± 514,50)	1,25 ± 0,35 (99,36 ± 25,17)			
4	9.446,10** ± 778,50	40,27 ± 3,52 (3.767,50* ± 665,06)	52,33 ± 6,69 (4.874,10* ± 396,16)	2,41 ± 0,52 (235,59 ± 57,56)			
5	16.633,30** ± 982,60	47,00 ± 3,62 (7.862,90* ± 863,25)	52,07 ± 3,54 (8.541,80* ± 798,10)	1,69 ± 0,49 (268,07 ± 79,95)			
6	23.350,00** ± 2.025,00	42,16 ± 1,84 (9.716,50* ± 1.112,63)	55,00 ± 2,99 (13.001,12* ± 1.724,15)	2,75 ± 0,49 (696,29* ± 171,40)			
7	22.411,50** ± 1.719,40	55,27 ± 3,52 (12.126,22* ± 806,99)	39,09 ± 3,40 (9.248,00* ± 1.390,95)	5,63 ± 1,07 (1.271,22* ± 266,11)			

O nº de animais usados foi de 14 para cada resultado. Os nºs. entre parênteses representam o nº de cada leucócito por mm^3 de sangue. ±EPM = Erro padrão da média. Diferença entre as médias dos animais infectados em relação aos normais, estatisticamente significativa - * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

co é visto na tabela 4. Nenhum dos inibidores utilizados alterou o grau de parasitemia dos animais, bem como a relação peso pulmão/peso corporal (Índice de edema), de animais normais. O tratamento dos animais com fenoxibenzamina, provocou um profundo e feito sobre o desenvolvimento do edema pulmonar. Este bloqueador reduziu drasticamente o edema, em todos os dias analisados, ou seja, 5º, 6º e 7º dias de infecção. Metisergida, um inibidor dos receptores serotoninérgicos, também inibiu o aumento da relação de Staub no 6º e 7º dias da doença, não o reduzindo no 5º dia. O tratamento dos animais infectados, com um depletor da síntese de 5-hidroxitriptamina, p-clorofenilalanina, apresentou efeito similar à metisergida, variando apenas quanto ao grau de inibição. Um potente inibidor da síntese de prostaglandinas, indometacina, também reduziu acentuadamente o edema pulmonar malárico dos animais, em ambos os dias analisados.

A influência destes inibidores sobre a hipotermia observada nos camundongos infectados é vista na tabela 5. Essas drogas não alteraram a temperatura corporal dos animais normais. A fenoxibenzamina potenciou a hipotermia dos animais nos 5º, 6º e 7º dias da infecção. A metisergida provocou uma potenciação da hipotermia, estatisticamente significativa apenas no 6º dia da doença ($p < 0,005$). A potenciação da hipotermia provocada pela p-clorofenilalanina, nos animais infectados, não foi estatisticamente significativa. A indometacina potenciou significativamente a hipotermia, nos 5º e 6º dias. No 7º dia, a potenciação não foi estatisticamente significativa.

Nas figuras 5 e 6 são mostrados os efeitos da injeção endovenosa de sobrenadante de leucócitos oriundos de animais infectados com *P. berghei* no sétimo dia de infecção. A administração de 0,1 ml do sobrenadante que esteve em contato prévio com 10^5 leucócitos provocou uma redução significativa da temperatura corporal nos intervalos de 30, 60, 120 e 180 minutos após a aplicação endovenosa (Fig. 5). O efeito da injeção de 0,1 ml do sobrenadante que esteve em contato com 10^6 leucócitos foi mais persistente e apresentou um aspecto monofásico (Fig. 6). A administração de salina estéril (NaCl 0,9%), bem como sobrena -

TABELA 4

Percentagem de inibição do edema pulmonar de camundongos infectados com *P. berghei*, resultante do tratamento com fenoxibenzamina, metisergida, paraclorofenilalanina e indometacina em relação aos animais apenas infectados.

FÁRMACOS	% DE INIBIÇÃO DO EDEMA PULMONAR		
	5º DIA	6º DIA	7º DIA
Fenoxibenzamina	63,36*** (10)	52,71*** (9)	76,27*** (4)
Metisergida	6,6 (4)	76,35**** (5)	55,23** (3)
Paraclorofenilalanina	9,1 (5)	32,36* (5)	71,18**** (5)
Indometacina	64,82**** (11)	55,62*** (7)	60,59** (4)

() Número de animais utilizados

* A diferença entre as médias foi estatisticamente significativa (* $p < 0,05$ ** $p < 0,02$

*** $p < 0,005$ **** $p < 0,001$).

TABELA 5

Percentagem de potenciação da hipotermia de camundongos infectados com *P. berghei*, resultante do tratamento com fenoxibenzamina, metisergida, paraclorofenilalanina e indometacina em relação aos animais apenas infectados.

FÁRMACOS	% DE POTENCIAÇÃO DA HIPOTERMIA					
	5º DIA		6º DIA		7º DIA	
Fenoxibenzamina	70,72***	(8)	50,51**	(10)	52,62*	(4)
Metisergida	15,97	(4)	58,07*	(4)	8,43	(4)
Paraclorofenilalanina	15,97	(4)	48,45	(5)	10,46	(5)
Indometacina	99,62***	(11)	73,54***	(8)	32,84	(3)

() Número de animais utilizados

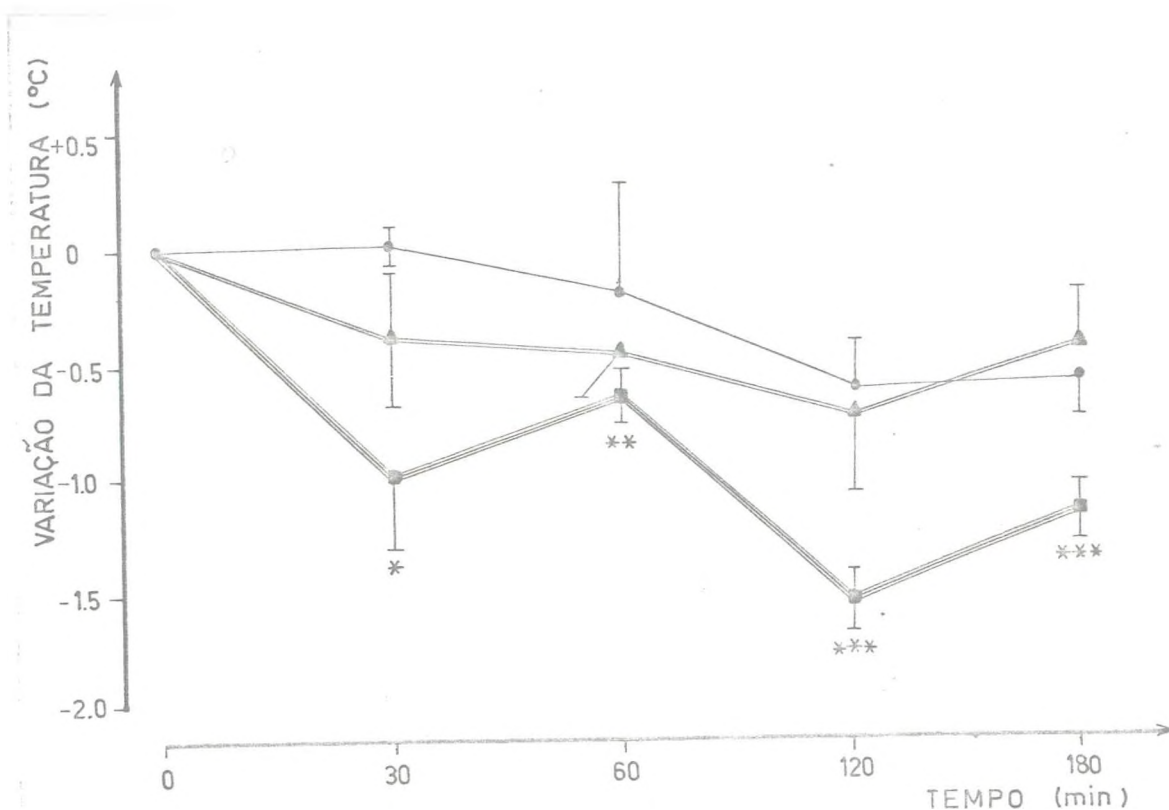
* A diferença entre as médias foi estatisticamente significativa (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$).

Os experimentos foram realizados numa temperatura ambiente entre 23 - 24°C.

dantes de suspensão de leucócitos em quantidades equivalentes (10^5 e 10^6) de animais normais não modificou a temperatura corporal de forma significativa (Fig. 5 e 6).

FIGURA 5

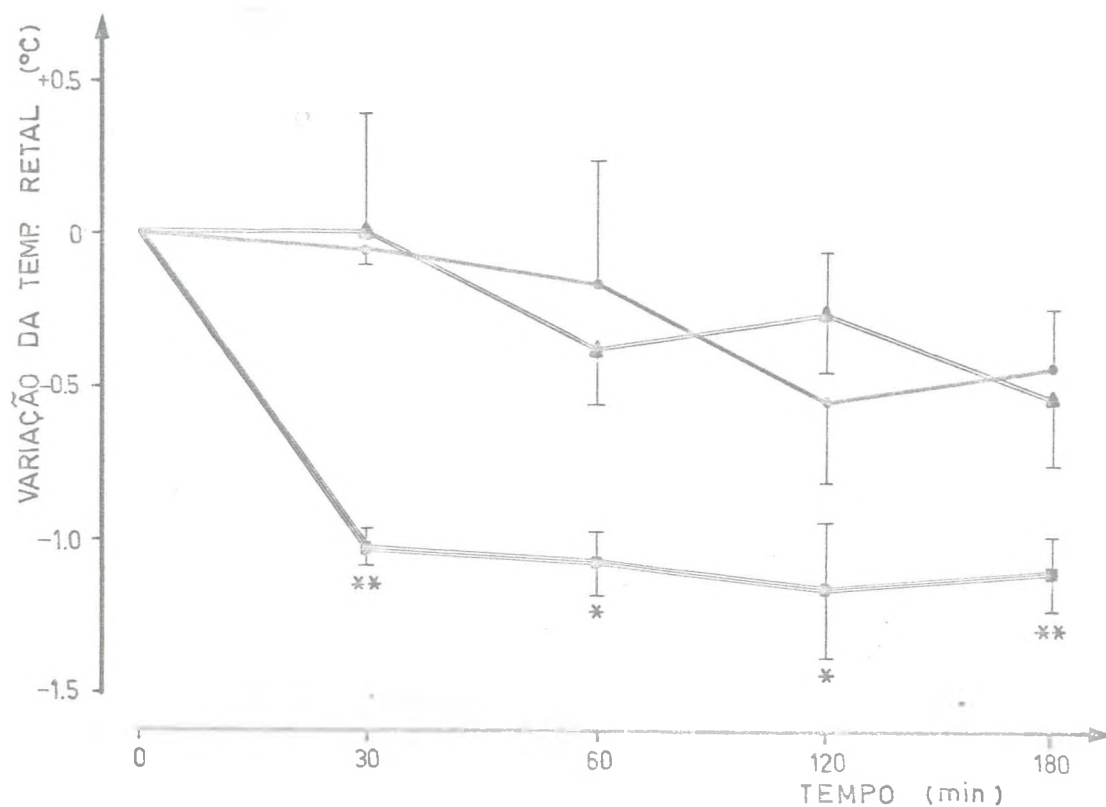


Temperatura corporal média de camundongos normais após injeção endovenosa de 0,1 ml de sobrenadante de suspensão de 10^5 leucócitos extraídos de animais infectados e incubados por 3 horas (■—■); de 0,1 ml de sobrenadante de suspensão de 10^5 leucócitos extraídos de animais normais e incubados por 3 horas (▲—▲) e de 0,1 ml de salina fisiológica (●—●). O número de animais utilizados para cada tempo experimental foi de 5.

As barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM). Nível de significância (p) obtido pela aplicação do teste "t" de Student para amostras pareadas - * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

A temperatura ambiente foi mantida entre 23 - 24°C durante as mensurações.

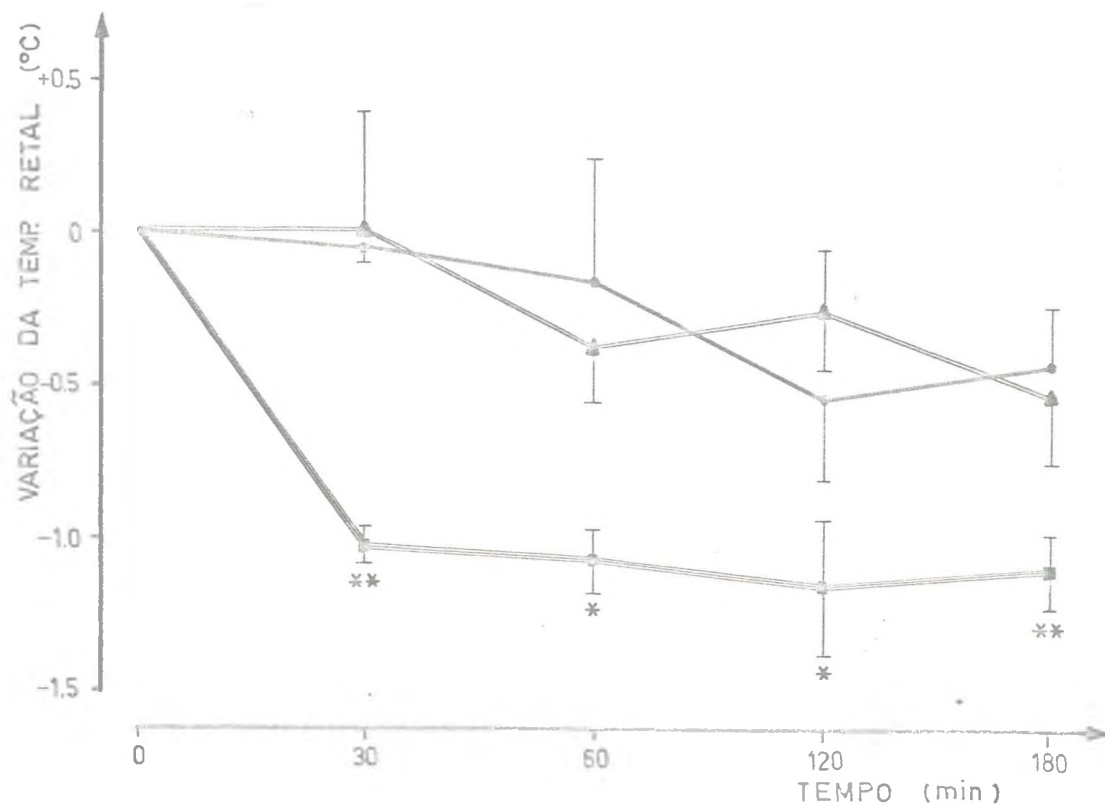
FIGURA 6



Temperatura corporal média de camundongos normais após injeção endovenosa de 0,1 ml de sobrenadante de suspensão de 10^6 leucócitos extraídos de animais infectados e incubados por 3 horas (■—■); de 0,1 ml de sobrenadante de suspensão de 10^6 leucócitos extraídos de animais normais e incubados por 3 horas (▲—▲) e de 0,1 ml de salina fisiológica (●—●). O número de animais utilizados para cada tempo experimental foi de 5.

As barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM). Nível de significância (p) obtido pela aplicação do teste "t" de Student para amostras pareadas * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$. A temperatura ambiente foi mantida entre $23 - 24^{\circ}\text{C}$ durante as mensurações.

FIGURA 6



Temperatura corporal média de camundongos normais após injeção endovenosa de 0,1 ml de sobrenadante de suspensão de 10^6 leucócitos extraídos de animais infectados e incubados por 3 horas (■—■); de 0,1 ml de sobrenadante de suspensão de 10^6 leucócitos extraídos de animais normais e incubados por 3 horas (▲—▲) e de 0,1 ml de salina fisiológica (●—●). O número de animais utilizados para cada tempo experimental foi de 5.

As barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM). Nível de significância (p) obtido pela aplicação do teste "t" de Student para amostras pareadas * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$. A temperatura ambiente foi mantida entre $23 - 24^{\circ}\text{C}$ durante as mensurações.

DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que a infecção malárica induzida em camundongos pelo *Plasmodium berghei* provocou uma progressiva e intensa parasitemia durante os 7 dias em que os animais sobreviveram (Tabela 1).

O hematócrito destes animais sofreu um decréscimo progressivo com o desenvolvimento da doença (Tabela 1). A causa desta redução se encontra na forma de evolução do plasmódio, já que sua multiplicação ocorre, também, no interior dos eritrócitos. Uma vez parasitado, o eritrócito pode sofrer ruptura e/ou ser fagocitado pelas células do sistema fagócito-mononuclear. Outro fato que contribui para a intensa anemia observada é a fagocitose de hemácias não parasitadas, que ocorre por motivos ainda não muito bem elucidados (Tosta, 1976; Hall, 1977).

Apesar dos níveis de proteínas plasmáticas totais não terem sofrido alterações estatisticamente significantes (Tabela 1), provavelmente, em termos qualitativos, variações devem ter ocorrido, não tendo sido detectadas pela técnica utilizada. Entretanto, os níveis séricos do precursor da bradicinina, o bradikininógeno (BKG) plasmático, sofreram variações no decurso da doença (Figura 1). É possível que estas alterações (aumentos significativos nos 1º, 3º e 5º dias e queda progressiva a partir do 5º dia de infecção) estejam correlacionadas com a gênese de algumas das alterações fisiopatológicas que se desenvolvem na infecção.

Vários dados da literatura indicam o envolvimento de cininas na infecção malárica e, entre eles, podemos citar:

- a) Presença de cininas na urina de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* (Goodwin e Richards, 1960) e queda dos níveis de BKG nos animais com parasitemia superior a 30% (Ohtomo e Katófi, 1972);

- b) Queda progressiva e brusca nos níveis séricos de BKG nos estágios finais da infecção em Macaca mulata infectados com *Plasmodium knowlesi* (Tella e Maegraith, 1966), bem como elevação da concentração plasmática de calicreínas (Onabanjo e Maegraith, 1970);
- c) Aumento de atividade de cininas plasmáticas em Macaca mulata inoculados com *P. knowlesi*. Apesar disto, os níveis circulantes de cininas encontravam-se elevados (Onabanjo e colaboradores, 1970; Onabanjo e Maegraith, 1971), o que levou os autores a postular a existência de um alto "turnover" de cininas durante a infecção.

É possível então, que nos animais infectados com *P. berghei*, tenha ocorrido a produção de cininas a partir do bradicinínogênio plasmático durante a infecção. A elevação das concentrações de BKG plasmático observada nos 5 primeiros dias da doença pode ter sido devido a um aumento de sua síntese por parte do fígado, estimulada tanto pelo seu consumo, como pela instalação de um quadro inflamatório, similarmente ao aumento da síntese de BKG pelo fígado de ratos após injeções do agente inflamatório turpentine (Borges e Gordon, 1976).

Cordeiro, 1978, demonstrou que a injeção endovenosa de adrenalina em ratos provocou queda seguida de aumento nos níveis de BKG plasmático. O aumento ocorreu já a partir de 25 minutos após a aplicação da catecolamina. Curiosamente, o mesmo autor observou que ratos, diferentemente do homem, quando submetidos a exercícios físicos exaustivos (por exemplo, natação), nos quais ocorre hiperatividade do sistema nervoso simpático, apresentavam aumento dos níveis de BKG plasmático. Este aumento foi inibido pelo tratamento prévio dos animais com o α -bloqueador, fenoxibenzamina. Hiperatividade simpática foi descrita em Macaca mulata inoculado com *P. knowlesi* (Skirrow e colaboradores, 1965). Sharma e colaboradores, em 1979, relataram que, em infecções maláricas, ocorre hipertrofia das adrenais. Quando se trataram os camundongos infectados com *P. berghei*, com fenoxibenzamina, o ede-

ma pulmonar foi parcialmente inibido (Tabela 4).

Estas observações tomadas em conjunto sugerem que provavelmente o sistema nervoso simpático dos camundongos infectados encontrava-se hiperativado, e mais ainda, que o controle dos níveis de BKG plasmático sofreu influência dos mediadores adrenérgicos semelhantes ao observado em ratos.

O comprometimento do fígado nos estágios finais da infecção, bem como a potenciação do consumo do BKG, levou ao predomínio dos mecanismos de sua degradação sobre os de sua síntese, ocasionando a queda do precursor cinínico no 7º dia de infecção.

Embora existam poucas informações na literatura sobre a participação dos leucócitos nas alterações fisiopatológicas que ocorrem na malária, acredita-se que em camundongos infectados com *P. berghei*, os leucócitos participem direta e/ou indiretamente no desenvolvimento da doença. O leucograma dos animais infectados mostrou uma intensa leucocitose com predomínio de linfócitos e neutrófilos (Tabela 3).

Já foi demonstrado que o consumo do BKG plasmático pode ocorrer por ação de enzimas provenientes de leucócitos polimorfonucleares (Melmon e Cline, 1967; Movat e colaboradores, 1973). Posteriormente, Rothschild e colaboradores, 1974, demonstraram que a ação cininogenopênica da adrenalina ou da noradrenalina em ratos, se dá através dos granulócitos, e que, possivelmente, neutrófilos e/ou basófilos são as células responsáveis por este efeito. Com relação a participação dos granulócitos em processos inflamatórios, existem extensas revisões (Hurley, 1978; Wilkinson, 1978; Bainton, 1980; Baggiolini, 1980; Smith e Goetzl, 1980) que não colocam dúvidas no envolvimento desta espécie celular na efetuação e mediação de vários estados inflamatórios. Portanto, é razoável supor que os neutrófilos participem intermediariamente liberando mediadores responsáveis pelo consumo do BKG e geração de cininas, nos animais infectados.

Outros eventos que ocorrem na malária podem também contribuir para a degradação do BKG. Entre eles, podem ser citados: ativação do sistema complemento (Neva e colaboradores, 1970; Weiss, 1978), coagulação intravascular disseminada e anóxia tecidual (Hall, 1977).

Cannon, em 1941, postulou que os fenômenos circulatórios da malária são similares aos de uma inflamação aguda, com a possível liberação dos mesmos mediadores de um processo inflamatório agudo. Revisões mais recentes sobre a fisiopatologia da malária suportam, em parte, a visão de Cannon e entre elas, podem ser citadas a de Hall, 1977, e os trabalhos do grupo de Macgrath. (ref. 38; 48; 49; 50; 51; 52; 53 e 61).

Quando animais infectados foram tratados com o agente leucopenizante methotrexate (Cordeiro e colaboradores, 1977), ou com drogas anti-inflamatórias (Tabela 4), observou-se uma reversão parcial do quadro patológico nestes animais. Estes fatos deram suporte à tese de Cannon, bem como à sugestão da participação intermediária de leucócitos na infecção malárica.

Acredita-se que uma das principais "causae mortis" dos camundongos maláricos seja o desenvolvimento de um drástico e progressivo edema pulmonar (Figura 2) durante a infecção. Apesar de existirem inúmeras técnicas para avaliação do edema pulmonar, a Relação de Staub, Peso do pulmão (peso úmido) / peso corporal (Staub, 1974), forneceu um índice de grande confiabilidade e reprodutibilidade. Além da utilização desta relação com índice de mensuração do edema pulmonar, cortes histológicos dos pulmões de animais, realizados no último dia de infecção, revelaram intenso edema alveolar concomitante com um infiltrado inflamatório peribronquiolar, com predomínio de células mononucleares (Figura 3).

Apesar de escassos os dados na literatura descrevendo edema pulmonar em modelos experimentais de malária, já em 1905 Watson descreveu edema pulmonar em humanos maláricos. Após este relato, várias publicações têm descrito casos de edema pulmonar em humanos infectados com *Plasmodium falciparum* (Falconer, 1919; Rigdon, 1942, Bergin, 1967; Brooks e colaboradores, 1968; Malloy e colaboradores, 1967; Neva e colaboradores, 1970; Brooks e colaboradores, 1968; Hall, 1977). Com relação à causa do edema pulmonar na malária, existem divergências entre autores. Hall, 1977, descreveu que a queda da pressão oncótica, devido a diminuição da síntese proteica hepática, principalmente albumina, seja a

principal causa do edema. Entretanto, Brooks e colaboradores, 1967, correlacionaram o edema pulmonar com o aumento da permeabilidade vascular.

Os resultados obtidos neste trabalho são evidências experimentais que suportam a tese de Brooks e colaboradores, pois o tratamento dos animais infectados com drogas que bloqueiam a síntese ou os receptores de mediadores vasoativos e permeabilizantes, inibiu significativamente o edema pulmonar (Tabela 4). O fato de que os níveis de proteínas séricas totais não sofreram variações significativas durante o desenvolvimento da doença, também suporta a inferência de que a pressão oncótica não seja a principal causa do edema, em nosso sistema.

A inibição do edema pulmonar devido ao tratamento dos animais infectados com o α -bloqueador fenoxibenzamina (Tabela 4), corrobora a observação do aumento da atividade do sistema nervoso simpático em infecções maláricas (Skirrow, 1965; Sharma, 1979). Possivelmente, o mediador simpático interage com os receptores α -adrenérgicos dos leucócitos e ativa o sistema de formação de cininas (Assreuy Filho, Comunicação Pessoal), as quais seriam responsáveis, em parte, pelo edema.

Visscher e colaboradores, 1956, estudando edema pulmonar adrenalínico em ratos, sugeriram a possibilidade de uma ação direta do mediador simpático, provocando alterações hemodinâmicas que teriam como consequência, o desenvolvimento do edema pulmonar. Possivelmente isso não ocorreu nos animais parasitados, visto que a pressão arterial de camundongos infectados com *P. berghei* caiu do nível normal de 80,2 para 51,4 mmHg na fase final da infecção (Ohtomo e Katori, 1972).

É provável que a serotonina também participe da mediação das alterações pulmonares encontradas na infecção malárica. Maeraith e colaboradores, 1959, descreveram que *Macaca mulata* infectados com *P. knowlesi* encontravam-se em estado de choque no estágio final da infecção. Freire-Maia e Beraldo, 1965, demonstraram que, no choque anafilático em ratos, existe participação de serotonina. Consumo de plaquetas, grandes armazenadoras e potenciais liberadoras de serotonina, ocorre na malária (Neva e co

laboradores, 1970). A fenoxibenzamina tem também uma ação antiserotoninérgica (Siwadlowski e colaboradores, 1970), e além disto, o tratamento dos animais infectados com metisergida ou com o inibidor da síntese de serotonina, paraclorofenilalanina (PCPA), inibiu o edema nos dois últimos dias de infecção, falhando em alterar o quadro edematoso no 5º dia (Tabela 4). Outros estudos devem ser realizados com a finalidade de demonstrar se a serotonina é liberada apenas na fase final da infecção ou durante todos os estágios da doença.

A participação de prostaglandinas aumentando a permeabilidade vascular ou potenciando o efeito de outros mediadores da inflamação tem sido amplamente demonstrada (Komoriya e colaboradores, 1978; Williams, 1979; Thomas, 1980). O tratamento dos animais com um potente inibidor da síntese destes derivados de ácidos graxos, indometacina, inibiu significativamente o edema pulmonar. Tal fato sugere que prostaglandinas estão sendo formadas e interferindo na gênese do edema pulmonar.

O envolvimento de cininas no desenvolvimento do edema, possivelmente, é um dos fatores preponderantes, visto que além da produção deste potente mediador inflamatório via ativação do sistema nervoso simpático (Cordeiro, 1978), vários outros eventos discutidos anteriormente, podem ativar o sistema gerador de cininas, os quais poderiam, então, contribuir para a gênese e manutenção do edema.

A participação intermediária dos leucócitos liberando fatores de permeabilidade, enzimas hidrolíticas, fatores quimiotáticos (Valone, 1980; Bainton, 1980), ou ativando o sistema cinnonógeno-cininas por mecanismos outros que não através da participação de mediadores simpáticos, possivelmente ocorre na malária. Greenbaum, 1975, relatou a existência das leucocininas, polipeptídeos com propriedades semelhantes a da bradicinina e que seriam liberadas de um precursor inativo do plasma, o leucocinonógeno. O autor afirmou que o aparelho enzimático formador de leucocininas estaria presente em todos os leucócitos. O tratamento dos animais infectados com pepstatina, um inibidor das enzi -

mas formadoras de leucocininas, deve ser realizado a fim de investigar o possível papel destas cininas na fisiopatologia da infecção malárica.

Apresentando comportamento diferente do observado na espécie humana, onde observam-se acessos febris periódicos (Pessoa, 1974; Hall, 1977), camundongos infectados com *P. berghei*, apresentaram intensa e progressiva hipotermia no decorrer da infecção (Figura 4). Esses resultados sugerem que a hipotermia observada nos camundongos se deveu, em parte, ao resultado de um conjunto de fenômenos onde ocorrem:

- a) Participação intermediária dos leucócitos liberando mediadores leucocíticos;
- b) Ação das catecolaminas e de serotonina a nível dos centros termorreguladores existentes no hipotálamo;
- c) Possível envolvimento de outros mediadores não analisados no presente trabalho.

Apesar de Brittain e Handley, 1967, terem descrito que, em camundongos normais, a estimulação dos receptores α -adrenérgicos centrais provocou hipotermia, e a dos receptores β hipertermia, os camundongos infectados que foram tratados com fenoxibenzamina tiveram a hipotermia significativamente potenciada (Tabela 5). Estes dados sugerem uma ação hipertermiante para as catecolaminas. Esta hipótese está de acordo com os resultados de Slater e colaboradores, 1979, os quais reverteram a hipotermia de camundongos tratados com reserpina, utilizando inibidores de recaptção das catecolaminas, enquanto que inibidores da recaptção de serotonina falharam em reverter o quadro. Segundo estes autores, a hipotermia induzida pela reserpina foi devido à depleção das catecolaminas e, reforçando esta idéia, os autores descreveram que inibidores das monoaminas oxidases também bloquearam o fenômeno hipotérmico.

Brittain e Handley, 1967, Feldberg, 1975, e Hellon, 1975, descreveram que a serotonina, injetada nos ventrículos cerebrais causou hipotermia em camundongos. O tratamento dos animais com

inibidor da síntese de serotonina, paraclorofenilalanina (PCPA), bem como com o inibidor dos receptores serotoninérgicos, metiser_gida, tiveram efeitos muito semelhantes (Tabela 5), sendo que apenas a metiser_gida potenciou significativamente a hipotermia no 6º dia de infecção. Nos demais resultados, a potenciação não foi estatisticamente significativa. Outros estudos devem ser realizados para demonstrar se a serotonina apresenta um efeito hipotérmico em camundongos infectados com *P. berghei*, ou se o efeito observado foi devido a uma interferência com o sistema catecolaminérgico, já que Welch e Welch, 1968, mostraram uma ação inibidora da síntese de catecolaminas causada pelo PCPA.

O tratamento dos animais infectados com o inibidor de síntese de prostaglandinas, indometacina (Vane, 1971, 1973; Willis e Cornelsen, 1973), potenciou a hipotermia em níveis significativos no 5º e 6º dias de infecção (Tabela 5). No 7º dia esta potenciação não foi significativa. A participação das prostaglandinas da série E na gênese da febre é amplamente demonstrada (Milton, 1976; Feldberg, 1978). Segundo estes autores, as prostaglandinas são sintetizadas ao nível do hipotálamo anterior devido a uma ação estimulante dos pirógenos endógenos e que o mecanismo de ação de drogas antipiréticos se dá através da inibição da síntese destes derivados de ácidos graxos. O tratamento dos animais com indometacina, possivelmente, determinou o predomínio dos mecanismos hipotérmicos. A potenciação da hipotermia no 7º dia não foi estatisticamente significativa, talvez, devido ao reduzido tamanho da amostra.

Quando tentou-se correlacionar as alterações de temperatura observadas nos camundongos infectados com a formação de substância prostaglandina-símile no sistema nervoso central (SNC), observou-se que no decorrer da infecção ocorreram variações nas concentrações de substâncias prostaglandina-símile no SNC, mas somente no último dia de infecção os valores encontrados foram estatisticamente diferentes dos observados em animais normais (Tabela 2). Neste dia os níveis de substância prostaglandina-símile no SNC encontravam-se extremamente elevados, mas os animais estavam profundamente hipotérmicos. Uma possível explicação para o

fenômeno é que, devido a dificuldades técnicas utilizou-se o cérebro como um todo para realizar as dosagens de substâncias prostaglandina-símile e não somente o hipotálamo, que é a área diretamente envolvida com os mecanismos de alterações da temperatura corporal. Devido a isto, provavelmente, os valores encontrados se referem tanto as prostaglandinas da série E, liberadas no hipotálamo e que estão envolvidas com efeitos hipertérmicos, como também a outras séries de prostaglandinas, como por exemplo, a série F, liberadas em outras áreas do cérebro não envolvidas com alterações da temperatura corporal. Gilmore e colaboradores, 1968, descreveram que a principal prostaglandina encontrada no SNC é a $PGF_2\alpha$. Hellon, 1975 e Milton, 1976, descreveram que prostaglandinas A_1 , $F_1\alpha$ e $F_2\alpha$ não são efetivas, quando comparadas à PGE_1 , em estimular os centros termorre reguladores. Com relação aos órgãos isolados utilizados para as dosagens de substâncias prostaglandina-símile, notou-se que a preparação de cólon de rato apresentou maior sensibilidade em relação às outras preparações utilizadas (estômago de rato e reto de pinto), para um mesmo volume do extrato de cérebro. Esta observação está em concordância com a de Moncada e colaboradores, 1978, que descreveram que o cólon de rato é mais sensível à ação de $PGF_2\alpha$ do que às ações das prostaglandinas da série E.

Desta forma acredita-se que, embora prostaglandinas da série E (agentes hipertérmicos, pois o tratamento com indometacina potenciou a hipotermia malárica) estejam sendo produzidas centralmente nos camundongos maláricos, os mecanismos hipotérmicos devem ser predominantes, pois o efeito resultante é uma enérgica hipotermia. Além do mais, os resultados obtidos não permitem dizer ao certo, qual(is) série(s) de prostaglandina(s) está(ão) sendo produzida(s) em maior concentração durante a infecção. Estudos de análise química devem ser realizados para que se possa resolver este problema.

Também devem ser realizados estudos para demonstrar se outros mediadores conhecidos pela literatura como hipotermiantes, estão contribuindo para a hipotermia malárica (dentre os quais a histamina, Hellon, 1975; dopamina, Brittain e Handley, 1967; bem

como as endorfinas, Lin e colaboradores, 1979).

Os resultados obtidos com relação à participação dos leucócitos na gênese das alterações de temperatura abrem novas perspectivas para o entendimento da hipotermia malárica.

A injeção do sobrenadante proveniente da incubação de leucócitos extraídos do sangue de camundongos infectados em animais normais, mimetizou a hipotermia observada durante a infecção. O decréscimo da temperatura observada foi dose-dependente (Figuras 5 e 6). Cordeiro e colaboradores, 1977, demonstraram que a hipotermia observada durante a infecção malárica foi inibida quando os animais foram tratados com methotrexate (agente leucopênico), o que os levou a postular uma possível participação intermediária dos leucócitos no desenvolvimento da hipotermia. Vários autores têm demonstrado que os leucócitos, bem como várias células do sistema fagócito-mononuclear, quando apropriadamente estimuladas, liberam mediadores conhecidos como pirógenos endógenos, os quais, ao nível do hipotálamo anterior, liberam prostaglandinas da série E (Bornstein e Woods, 1969; Hellon, 1975 ; Milton, 1976, Feldberg e Milton, 1978).

Kampschmidt e colaboradores, 1973, isolaram e purificaram parcialmente o Mediador Leucocítico Endógeno (LEM) extraído de granulócitos de exsudato peritonal de coelhos. Quando injetado em ratos, o LEM produziu, entre outras alterações, elevação dos níveis séricos de proteínas da fração α -2 globulina, que também são liberadas na fase aguda de um processo inflamatório, e liberação de neutrófilos da medula óssea. Embora o LEM, quando injetado em coelhos, tenha provocado febre (Kampschmidt e colaboradores, 1973), em ratos, o mediador leucocítico produziu hipotermia (Merriman e colaboradores, 1974). Como os pirógenos endógenos são produzidos pela mesma técnica utilizada para obtenção de LEM, foi aventada a hipótese de uma similaridade entre ambos. Entretanto, Gordon e Limãos, 1979, descreveram que os pirógenos endógenos são um dos constituintes do LEM.

Bodel e Miller, 1976, descreveram que camundongos, por possuírem alta condutância térmica, respondem aos pirógenos endó

genos com febre, somente em ambientes com temperatura acima de 30°C e que em temperaturas ambientes inferiores a 30°C, os animais respondem com normotermia ou hipotermia.

Apesar da necessidade de uma caracterização fisicoquímica, sugere-se que a resposta hipotérmica obtida em animais normais com o sobrenadante proveniente da incubação de leucócitos de animais infectados é devido ao LEM, demonstrando que este mediador leucocitário, já bastante estudado em modelos experimentais, é também liberado em doenças nas quais se desenvolve um quadro inflamatório. Dentro desta perspectiva pode-se explicar, parcialmente, os dados obtidos por Tella e Maegraith, em 1966, que encontraram aumento na fração α -2 globulina concomitantemente com queda nos níveis de bradicinínógeno plasmático, em Macaca mulata infectados com *P. knowlesi*.

Pretende-se futuramente determinar qual(is) célula(s) está(ão) envolvida(s) na produção do Mediador Leucocítico Endógeno durante o desenvolvimento da infecção malárica, bem como sua caracterização química.

Em conclusão, acredita-se que as alterações fisiopatológicas observadas em camundongos infectados com *P. berghei* são excelentes parâmetros para estudo "in vivo" da malária e inflamação experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BAGGIOLINI, M. The neutrophil. In: Handbook of Inflammation, Vol. 2 - The Cell biology of inflammation (Weissmann, G. ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 163 - 181, 1980.
02. BAINTON, D. F. The cells of inflammation: a general view. In: Handbook of Inflammation, Vol. 2 - The Cell biology of inflammation. (Weissmann, G. ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 1-23, 1980.
03. BASTARDO, T. & PERAZA, L. A. Action of chymotrypsin on experimental *Plasmodium berghei* infection in albino mice. Acta Cientifica Venezolana, 31: 48-52, 1980.
04. BERGIN, J. J. Malaria and the lung. Military Medicine, 132: 522-526, 1967.
05. BODEL, P. & MILLER, H. Pyrogen from mouse macrophages causes fever in mice. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 151: 93-96, 1976.
06. BOONPUCKNAVIG, V. & SITPRIJA, V. Renal disease in acute *Plasmodium falciparum* infection in man. Kidney International, 16: 44-52, 1979.
07. BORGES, D. R. & GORDON, A. H. Kininogen and kininogenase synthesis by the liver of normal and injured rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 28: 44-48, 1976.
08. BORNSTEIN, D. L. & WOODS, J. W. Species specificity of leukocytic pyrogens. Journal of Experimental Medicine, 130: 707-721, 1969.

09. BRITTAIN, R. T. & HANDLEY, S. L. Temperature changes produced by the injection of catecholamines and 5 - hidroxytryptamine into the cerebral ventricles of the conscious mouse. Journal of Physiology (London), 192: 805-813, 1967.
10. BROOKS, M. H.; MALLOY, J. F.; BARTELLONI, P. J.; TIGERTT, W. D.; SHEEHY, T. W. & BARRY, K. G. Pathophysiology of acute falciparum malaria. I. Correlation of clinical and biochemical abnormalities. American Journal of Medicine, 43 (4):735-744, 1967.
11. BROOKS, M. H.; KIEL, F. W.; SHEEHY, T. W. & BARRY, K.G. Acute pulmonary edema in falciparum malaria. A clinicopathological correlation. New England Journal of Medicine, 279 (14) : 732-737, 1968.
12. BUGAJSKI, J.; ZACNY, E. & ZDEBSKA, A. The involvement of central alpha-adrenergic and histamine H₂ - receptors in the hypothermia induced by clonidine in the rat. Neuropharmacology, 19: 9-15, 1980.
13. CANNON, P. R. Some pathologic aspects of human malaria. In: Symposium on human malaria. American Association for the Advancement of Science, 214 p. 1941.
14. COHEN, S. Immunity to malaria. Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences, 203: 323 - 345, 1979.
15. COLINA-CHOURIO, J.; MCGIFF, J. C.; MILLER, M. P. & NASJLETTI, A. Possible influence of intrarenal generation of kinins on prostaglandin release from the rabbit perfused kidney. British Journal of Pharmacology, 58: 165-172, 1976.
16. CORDEIRO, R.S.B.; CUNHA, F. Q.; VASCONCELOS, H. N.; FLORES, C.A. & ASSREUY, FILHO, J. Estudo do edema pulmonar e da

hipotermia em camundongos leucopênicos infectados com *Plasmodium berghei*. Ciência e Cultura, 29 (7): 616 p., 1977.

17. CORDEIRO, R. S. B. Influência de catecolaminas, exercício físico, frio, hemorragia e hidrocortisona sobre os níveis de bradicinínógeno circulante. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 1978.
18. COX, B.; KERWIN, R. W.; LEE, T. F. & PYCOCK, C. J. A dopamine-5-hydroxytryptamine link in the hypothalamic pathways which mediate heat loss in the rat. Journal of Physiology (London), 303: 9-21, 1980.
19. DINIZ, C. R. & CARVALHO, I. F. A micromethod for determination of bradykininogen under several conditions. Annals of the New York Academy of Sciences, 104: 77-89, 1963.
20. EISEN, V. & WALKER, D. I. Effect of ionizing radiation on prostaglandin-like activity in tissues. British Journal of Pharmacology, 57: 527-532, 1976.
21. FALCONER, A. W. The pulmonary manifestations in malaria. Quarterly Journal Medicine, 13: 25-34, 1919.
22. FELDBERG, W. S. Body temperature and fever: changes in our views during the last decade. Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences, 191: 199-229, 1975.
23. FELDBERG, W. S. & MILTON, A. S. Prostaglandins and body temperature. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 50/I - Inflammation. (Vane, J. R. and Ferreira, S. H. eds). Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York, pp.617-649, 1978.

24. FRAIRE, S. P. Problemas que dificultam el desarrollo normal de los programas de erradicacion de la malaria. Bulletin of the Pan American Health Organization, IX (4): 375 - 387, 1975.
25. FREIRE-MAIA, L. & BERALDO, W. T. Peptonic and anaphylactic shock in the rat. Acta Physiologica Latinoamericana, 15 (4): 362-370, 1965.
26. GILMORE, N.; VANE, J. R. & WYLLIE, J. H. Prostaglandins released by the spleen. Nature, 218: 1135-1140, 1968.
27. GOODWIN, L. G. & RICHARDS, W. H. G. Pharmacologically active peptides in the blood and urine of animals infected with Babesia rodhaini and other pathogenic organisms. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 32: 152-159, 1960.
28. GORDON, A. H. & LIMÃOS, E. A. Human blood and rabbit peritoneal leucocytes as sources of endogenous mediators. British Journal of Experimental Pathology, 60: 441-446, 1979.
29. GREENBAUM, L. M.; GREBOW, P.; JOHNSTON, M.; PRAKASH, A. & SEMENTE, G. Pepstatin: an inhibitor of leukokinin formation and ascitic fluid accumulation. Cancer Reserach, 35: 706-710, 1975.
30. HALL, A. P. The treatment of severe falciparum malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 71 (5): 367-378, 1977.
31. HELLON, R. F. Monoamines, pyrogens and cations: their actions on central control of body temperature. Pharmacological Reviews, 26 (4): 289-321, 1975.
32. HENSON, P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. Journal of Immunology, 6: 1535-1546, 1971.

33. HURLEY, J. V. The sequence of early events. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 50/I - Inflammation (Vane, J. R. and Ferreira, S. H. eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp. 26-67, 1978.
34. KAMPSCHMIDT, R. F.; UPCHURCH, H. F., EDDINGTON, C. L. & PULLIAM, L. A. Multiple biological activities of a partially purified leukocytic endogenous mediator. American Journal of Physiology, 224 (3): 530-533, 1973.
35. KOMORIYA, K.; OHMORI, H.; AZUMA, A.; KUROZUMI, S. & HASHIMOTO, Y. Prostaglandin I_2 as a potentiator of acute inflammation in rats. Prostaglandins, 15 (4): 557-564, 1978.
36. LIN, M. T.; CHERN, Y. F.; CHEN, F. F. & SU, C. Y. Serotonergic mechanisms of beta-endorphin-induced hypothermia in rats. Pflugers Archiv - European Journal of Physiology, 382: 87-90, 1979.
37. MAEGRAITH, B. G.; DEVAKUL, K. & LEITEAD, C. S. The terminal stages of *Plasmodium knowlesi* infection in Macaca mulatta. I. The clinical state: resuscitation by l-noradrenaline. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 53: 358 - 368, 1959.
38. MAEGRAITH, B. G.; JONES, E. S. & ANDREWS, W. H. H. Pathological processes in malaria: progress report. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 45 (1): 15-33, 1951.
39. MALLOY, J. P.; BROOKS, M. H. & BARRY, K. G. Pathophysiology of acute falciparum malaria. American Journal of Medicine, 43: 745-750, 1967.
40. MELMON, K. L. & CLINE, M. J. Interaction of plasma kinins and granulocytes. Nature, 213: 90-92, 1967.

41. MERRIMAN, C. R.; UPCHURCH, H. F. & KAMPSCHMIDT, R. F. Prostaglandin E₁, aspirin and the action of leukocytic endogenous mediator. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 188 (3): 516-519, 1974.
42. MIGASENA, P. & MAEGRAITH, B. G. Pharmacological action of antimalarial drugs. Action of chloroquine and hydrocortisone on blood brain barrier in *Plasmodium knowlesi* malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 61: 6 p, 1967.
43. MILTON, A. S. Modern views on the pathogenesis of fever and the mode of action of antipyretic drugs. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 28: 393-399, 1976.
44. MONCADA, S.; FERREIRA, S. H. & VANE, J. R. Bioassay of prostaglandins and biologically active substances derived from arachidonic acid. Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, 5: 211-236, 1978.
45. MOVAT, H. Z.; STEINBERG, S. G.; HABAL, F. M. & RANADIVE, N. S. Demonstration of a kinin-generating enzyme in the lysosomes of human polymorphonuclear leukocytes. Laboratory Investigation, 29 (6): 669-684, 1973.
46. NEVA, F. A.; SHEAGREN, J. N.; SHULMAN, N. R. & CANFIELD, C. J. Malaria: Host defense mechanisms and complications. Annals of Internal Medicine, 73 (2): 295-306, 1970.
47. OHTOMO, H. & KATORI, M. Reliable evidence of involvement of the kinin system in mouse malaria. Japanese Journal of Pharmacology, 22: 493-509, 1972.
48. ONABANJO, A. O.; BHABANI, A. R. & MAEGRAITH, B. G. The significance of kinin-destroying enzymes activity in *Plasmodium knowlesi* malarial infection. British Journal of Experimental

tal Pathology, 51: 534-540, 1970a.

49. ONABANJO, A. O. & MAEGRAITH, B. G. Inflammatory changes in small blood vessels induced by kallikrein (kininogenase) in the blood of Macaca mulatta infected with Plasmodium knowlesi. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 64 (2): 227-236, 1970b.
50. ONABANJO, A. O. & MAEGRAITH, B. G. Kallikrein as a pathogenic agent in Plasmodium knowlesi infection in Macaca mulatta. British Journal of Experimental Pathology, 51: 523-531, 1970c.
51. ONABANJO, A. O. & MAEGRAITH, B. G. Pathological lesions produced in the brain by kallikrein (kininogenase) in Macaca mullata infected with Plasmodium knowlesi. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 64(2): 237-242, 1970d.
52. ONABANJO, A. O. & MAEGRAITH, B. G. The probable pathogenic role of adenosine in malaria. British Journal of Experimental Pathology, 51: 581-586, 1970f.
53. ONABANJO, A. O. & MAEGRAITH, B. G. Circulating plasma kinins in malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 65: 5 p., 1971
54. PESSOA, S. B. Parasitologia Médica. 9a. ed. Guanabara Koogan. Capítulos 22 a 25, 1974.
55. REINHOLD, J. G. Standart methods of clinical Chemistry, vol. 1. New York Academic Press, 88 p., 1953.
56. RIGDON, R. H. A consideration of the mechanism of death in acute Plasmodium falciparum infection; report of a case. The American Journal of Hygiene, 36: 269-275, 1942.

57. ROTHSCHILD, A. M.; CORDEIRO, R. S. B. & CASTANIA, A. Lowering of kininogen in rat blood by catecholamines. Naunyn - Schmiedebergs Archives of Pharmacology, 282: 323-326, 1974.
58. ROTHSCHILD, A. M.; CORDEIRO, R. S. B. & CASTANIA, A. Acute pulmonary edema and plasma kininogen consumption in the adrenaline-treated rat: Inhibition by acetylsalicylic acid and resistance to salicylate and indomethacin. Naunyn - Schmiedebergs Archives of Pharmacology, 288: 319-321, 1975.
59. SHARMA, O. P.; SHUKLA, R. P.; SINGH, C. & SEN, A. B. Alterations in some biochemical parameters in mouse liver and spleen during infection with *Plasmodium berghei*. Indian Journal of Medical Research, 69: 944-948, 1979.
60. SIWADLOWSKI, W.; ARAVANIS, C.; WORTHEN, M. & LUISADA, A. A. Mechanism of adrenalin pulmonary edema and its prevention by narcotics and autonomic blockers. Chest, 57: 554-557, 1970.
61. SKIRROW, M. B.; CHONGSUPHAJAISIDDH, T. & MAEGRAITH, B. G. The circulation in malaria. II. Portal angiography in monkeys (*Macaca mulatta*) infected with *Plasmodium knowlesi* and is shock following manipulation of the gut. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 58: 502-510, 1965.
62. SLATER, I. H.; RATHBUN, R. C. & KATTAU, R. Role of 5-hydroxy tryptaminergic and adrenergic mechanism in antagonism of reserpine - induced hypothermia in mice. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 31: 108-110, 1979.
63. SMITH, J. A. and GOETZL, E. J. Cellular properties of eosinophils: regulatory, protective and potentially pathogenetic roles in inflammatory states. In: Handbook of Inflammation, vol. 2 - The Cell Biology of Inflammation (Weissmann, G. ed). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 189-216, 1980.

64. SNEDECOR, G. W. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa University Press, Iowa, 1963.
65. SPICER, A. J. Treatment and chemoprophylaxis of malaria. The Practitioner, 223: 521-526, 1979.
66. STAUB, N. C. Pulmonary edema. Physiological Reviews, 54:678-811, 1974.
67. TELLA, A. & MAEGRAITH, B. G. Studies on bradykinin and bradykininogen in malaria. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 60: 304-317, 1966.
68. THOMAS, G. Characteristics of prostaglandin E₁ potentiation of inflammatory activity of some agents. Prostaglandins, 19 (1): 39-50, 1980.
69. TOSTA, C. E. Imunidade na malária experimental. Interferência de anticorpos sobre a fagocitose de *Plasmodium berghei*. Tese de mestrado apresentada ao curso de Pós-graduação em doenças infecciosas e parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1976.
70. VALONE, F. H. Modulation of human neutrophil and eosinophil polymorphonuclear leukocyte chemotaxis: an analytical review. Clinical Immunology and Immunopathology, 15 (1):52-65, 1980.
71. VANE, J. R. The use of isolated organs for detecting active substances in the circulation. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 23: 360 p, 1964.
72. VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature, New Biology, 231: 232-235, 1971

73. VINCKE, I. H. & LIPS, M. Un nouveau Plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo, *Plasmodium berghei* n. sp. Annales de La Società Belge de Medicine Tropicale, 28:97-99, 1948.
74. VISSCHER, M. B.; HADDY, F. J. & STEPHENS, G. Pharmacology and physiology of lung edema. Pharmacological Reviews, 8:389-434, 1956.
75. WATSON, M. Some clinical features of quartan malaria. The Indian Medical Gazette, — : 49-52, 1905.
76. WEISS, M. L. Immune complexes in the lungs of mice infected with *Plasmodium berghei*. Israel Journal of Medical Sciences, 14 (6): 655-658, 1978.
77. WELCH, A. S. & WELCH, B. L. Effect of stress and para-chloro phenylalanine upon brain serotonin, 5-hydroxyindole acetic acid and catecholamines in grouped and isolate mice. Biochemical Pharmacology, 17: 699-708, 1968.
78. WILKINSON, P. C. The adhesion, locomotion and chemotaxis of leucocytes. In: Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 50/I - Inflammation (Vane, J. R. and Ferreira, S. H. eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp. 109-137, 1978.
79. WILLIAMS, T. J. Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation. British Journal of Pharmacology, 65: 517-524, 1979.
80. WILLIS, A. L. & CORNELSEN, M. Repeated injection of prostaglandin E₂ in rat paws induced a chronic swelling and a marked decrease in pain threshold. Prostaglandins, 3: 353 p, 1973.