

CARLOS ALBERTO FLORES

UMA AVALIAÇÃO FISIOPATOLÓGICA DA PARTICIPAÇÃO DE
CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS NA MALÁRIA EXPERIMENTAL.

Tece
615.1
F65720

ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro.

BIBLIOTECA CENTRAL
88.017
22 / 03 / 88

35051

R.61

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº: 639434	
01 / 07 / 97	

UMA AVALIAÇÃO FISIOPATOLÓGICA DA PARTICIPAÇÃO DE
CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS NA MALÁRIA EXPERIMENTAL.

CARLOS ALBERTO FLORES

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
FORTALEZA - 1983

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.



Carlos Alberto Flores

Dissertação aprovada em 08/07/83, por:

Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles

Prof. Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro

À meus pais,

Getúlio e Francisca

À Maria do Socorro e Marcelo

Dedico, ainda, este trabalho

ao Prof. Luiz R. Capelo (in

memoriam).

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Renato Sérgio Balão Cordeiro, pela amizade, pelo constante incentivo e orientação desde o início de nosso treinamento científico;
- Ao Jamil Assreuy Filho, Fernando de Queiroz Cunha, Ana Maria Assreuy e Marco Aurélio Martins, pelo decisivo apoio e amizade, nos momentos mais difíceis;
- Aos Profs. Néilson Vaz e Thales Torres pela amizade e ajuda inestimável, fornecendo-nos a cepa de animais isogênicos e abrindo as portas de seus laboratórios para que pudéssemos realizar parte do trabalho;
- À Dra. Adela Rosenkrans, pela ajuda inestimável fornecendo parte dos animais utilizados neste trabalho;
- À Patrícia Silva, Maria das Graças Henriques, Cristina Coelho, Patrícia Gardino, José Brandão, Waldinez Lima e Dayse Rangel, pela amizade e incentivo;
- Ao Prof. Carlos Eduardo Tosta, pelas valiosas críticas e sugestões;
- Aos Srs. Mardonio Guedes, Petronio Timo, Antonio Fernando de Oliveira, Solano Martins, Olídio Faustino da Silva, Paulo José Ferreira e Amarílio de Oliveira, pelo apoio técnico, boa vontade e paciência dispensados;

- Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará e aos amigos do Curso de Pós-Graduação, pela amizade e auxílio prestados;
- A Silvia Regina Ludolff Barretto pela ajuda prestada e paciência datilografando a primeira versão deste trabalho;
- Em especial à Maria do Socorro Sampaio Flores, pelo incentivo, amor e compreensão, em todos os momentos;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Í N D I C E

— — — — —

ABREVIACÕES	viii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO	xi
INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	7
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ABREVIACOES

- CME - Células mononucleares esplênicas
DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano
DHR - Diidrofolato redutase
DP - Desvio padrão
GTP - Trifosfato de guanosina
LEM - Mediador de leucócitos endógeno
MTX - Methotrexato
PABA - cido p-aminobenzóico
Pb - Plasmodium berghei
PCPA - p-clorofenilalamina
PGE₁ - Prostaglandina da série E₁
PGE₂ - Prostaglandina da série E₂
PGF_{2α} - Prostaglandina da série F_{2α}
PP/PC - Peso do pulmão / Peso corporal
STF - Salina tampo fosfato

ABSTRACT

The present work demonstrated that Swiss-44 or B 10A mice developed, during the P.berghei-malaria, a drastic pulmonary edema, hypothermia and leucocytosis (with neutrophilia and lymphocytosis). A close relationship between leucocytosis and pulmonary and body temperature changes were observed.

The treatment of infected animals (Swiss-44 or B 10A) with methotrexate (MTX) caused a strong inhibition of the pathologic alterations observed.

Swiss-44 mice treated with MTX or infected with P.berghei and infected with the parasite and treated with MTX presented no alterations on total plasma protein levels, during the seven days of study.

The administration of mononuclear splenic cells (CME) from normal isogenic mice to infected and MTX treated B 10A mice was ineffective in producing a reversal of the inhibited phenomena. However, normal mice that received transference of CME from infected animals (7th. day of infection) showed a discret rise in the Lung wet weight/Body weight ratio, that was maximal at 3rd. hour after the transference. This alteration was paralleled by neutrophils countings, although no relationship between total leucocytes or lymphocytes counts could be established.

These results showed evidences that blood white cells, possibly neutrophils and/or lymphocytes, could participate directly and/or indirectly in pulmonary edema and hypothermia observed in P.berghei-malaria.

SUMÁRIO

O presente trabalho demonstrou que tanto camundongos Swiss-44 como B 10A desenvolveram, durante a infecção causada pelo P.berghei, intenso edema pulmonar, hipotermia e leucocitose (com neutrofilia e linfocitose). Foi observado, também, uma estreita correlação entre a leucocitose e as alterações pulmonares e de temperatura corporal.

O tratamento com methotrexato (MTX) de ambas as espécies de camundongos infectadas com P.berghei foi capaz de inibir acentuadamente, o desenvolvimento das alterações patológicas observadas.

Camundongos Swiss-44 tratados com MTX, infectados com P.berghei e infectados com o plasmódio e tratados com MTX não apresentaram alterações nos níveis de proteínas totais, durante os sete dias de acompanhamento.

A reposição de CME (células mononucleares esplênicas) de doadores isogênicos normais em camundongos B 10A infectados com P.berghei e tratados com MTX não foi capaz de reverter os fenômenos anteriormente inibidos. No entanto, camundongos B 10A normais que receberam a transferência de CME oriundas de camundongos infectados (7º dia de infecção) apresentaram aumento,

embora discreto, da relação Peso do Pulmão / Peso Corporal, que se mostrou máximo, na 3ª hora após a transferência. Este aumento ocorreu paralelamente ao aumento do número de neutrófilos, embora não se tenha observado qualquer relação com o número de leucócitos totais ou de linfócitos circulantes.

Estes resultados apresentaram evidências de que células da linhagem leucocitária, possivelmente neutrófilos e/ou linfócitos, estariam participando direta e/ou indiretamente das alterações de edema pulmonar e hipotermia observadas em camundongos maláricos.

INTRODUÇÃO

A malária continua sendo uma das doenças para sitárias mais importantes do mundo, tanto por sua ampla distribuição como pelo alto grau de mortalidade que con tinua causando. Acredita-se que cerca de 2 bilhões de indivíduos continuam expostos ao risco de contraírem a doença e que mais de 200 milhões de casos de malária são registrados anualmente (Ferraroni e Speer, 1981). Somen te na África a mortalidade anual, acometendo principalmen te crianças, chega a cerca de 1 milhão de casos (Cohen, 1979). No Brasil, especificamente, observou-se um aumen to, em apenas dois anos, no número de casos registrados, que era de 88.630, em 1975, e passou a 104.436, em 1977 (OPAS, 1981).

A introdução do inseticida dicloro-difenil tri cloroetano (DDT) nos programas de erradicação gerou um excesso de otimismo e grandemente desestimulou, nos anos 50 e 60, a pesquisa básica em malária (Wyler, 1983). En tretanto, o ressurgimento da doença em áreas anteriormen te erradicadas (Cohen, 1979) e o recrudescimento em re giões como África e Ásia (OMS, 1982), na metade da década de 70, assim como o desenvolvimento de resistênci a dos plasmódios à drogas antimaláricas (Ferraroni e Speer, 1981), renovou o interesse e revela a necessidade de co nhecimentos sobre questões fundamentais, tais como, bio logia e comportamento dos insetos vetores, biologia do parasita e interação parasita-hospedeiro e suas conse qüências. Assim sendo, a procura de novos modelos pa

ra o estudo da fisiopatologia e/ou quimioterapia desta doença é de fundamental importância.

A interação plasmódio-hospedeiro vertebrado poderá resultar em três situações: 1) agressão ao plasmódio pelo hospedeiro através do desenvolvimento de mecanismos imunitários; 2) parasita e hospedeiro mantêm-se em equilíbrio com um mínimo de agressões mútuas e 3) desenvolvimento do parasita com agressão ao hospedeiro (Tosta, 1976).

Várias das alterações que podem resultar do desenvolvimento de plasmódios no hospedeiro vertebrado, como edemas cerebral (Maegraith e Fletcher, 1972; Yoeli, 1976) e pulmonar (Punyagupta et al., 1974; Cordeiro et al., 1976; Hall, 1977; Cunha, 1981; Muller, 1982), podem ser consideradas como processos inflamatórios agudos. Já em 1941, Cannon descreveu que a maioria dos eventos circulatórios que ocorrem na malária se assemelham a um quadro inflamatório agudo.

Um processo inflamatório se caracteriza como uma alteração da resposta tissular a estímulos lesivos. Apesar de toda a complexidade que cerca o fenômeno, a injúria local, quer seja química, física ou biológica, induz uma resposta aguda, imediata, cuja característica fundamental é se apresentar de forma estereotipada e, portanto, não específica. Os eventos que se seguem à aplicação do estímulo lesivo podem ser sumarizados como: vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma para o tecido intersticial, levando a formação de edema local; aumento da viscosidade

com redução gradativa do fluxo sangüíneo; aderência de células brancas à parede dos vasos (marginção leucocitária) e diapedese; aumento do fluxo e conteúdo protéico da linfa que drena a área inflamada (Ryan e Majno, 1977; Hurley, 1978; Sudo, 1979).

O envolvimento de mediadores característicos de uma reação inflamatória aguda, tais como, bradicinina, histamina, serotonina e prostaglandinas, na malária, tem sido objeto de vários estudos.

Goodwin e Richards (1960) demonstraram a presença de peptídeos farmacologicamente ativos na urina de camundongos infectados com vários parasitas, incluindo Babesia rodhaini, Tripanossoma brucei e Plasmodium berghei.

Tella e Maegraith (1962) relataram que macacos infectados com P. knowlesi apresentaram queda nos níveis de bradicininógeno plasmático e aumento da fração α -2 globulina do plasma.

Tella e Maegraith (1966) mostraram que Macaca mulatta infectados com P. knowlesi apresentaram os níveis de calicreína, enzima que cinde o bradicininógeno liberando bradicinina, elevados. Resultados semelhantes foram obtidos, no mesmo modelo experimental, por Onabanjo e Maegraith, (1970 a) que levantaram a hipótese de que a calicreína agiria tanto sobre o cininógeno plasmático como diretamente, alterando a permeabilidade vascular.

Migasena e Maegraith (1967) demonstraram um au

mento de passagem de albumina através da barreira hematoendefálica em macacos infectados com P. knowlesi. Esta alteração foi revertida com aplicação de drogas anti-inflamatórias.

Maegraith e Onabanjo (1970) descreveram aumento na concentração sangüínea de histamina em Macaca mulatta, na fase final da infecção causada por P. knowlesi.

Ohtomo e Katori (1972) demonstraram uma queda significativa dos níveis de bradicininógeno plasmático em camundongos infectados com P. berghei, que apresentaram níveis parasitêmicos superiores a 30%.

Cordeiro et al. (1976, 1977) demonstraram que camundongos infectados com P. berghei apresentaram, no decorrer da infecção, entre outras alterações, edema pulmonar, hipotermia e aumento, seguido de queda na fase final da doença, dos níveis de bradicininógeno plasmático. Os autores levantaram a hipótese de que, possivelmente, a bradicinina estaria participando das alterações descritas. Resultados semelhantes foram obtidos por Cunha (1981).

Cunha (1981) apresentou evidências de que o edema pulmonar em camundongos maláricos era mediado, em parte, também, por serotonina e prostaglandinas, já que o tratamento dos animais com inibidores de síntese destes dois autacóides ou dos receptores de 5-hidroxitriptamina, foi capaz de inibir parcialmente o desenvolvimento desta alteração patológica.

A participação de células da linhagem leucoci

tária na inflamação, basicamente através de fagocitose e liberação de várias substâncias (por exemplo: proteínas catiônicas; proteases, tais como, elastase, colagenase e ativador de plasminogênio; linfocinas; leucocininas, etc.), é um fato bastante conhecido e revisões amplas sobre o assunto podem ser encontradas em Ryan e Majno (1977); Vane e Ferreira (1978); Weissmann (1980); Rocklin et al. (1980).

Leme et al. (1976) e Bechara et al. (1976) demonstraram que ratos submetidos ao pré-tratamento com MTX apresentaram inibição, respectivamente, do desenvolvimento de edema de pata induzido pela carragenina e das alterações vasculares induzidas pela bradicinina, histamina e serotonina. Os autores relataram, também, que reposições de linfócitos em animais tornados leucopênicos pelo tratamento com a droga anti-fólica foram capazes de reverter os quadros anteriormente inibidos. Com base nestes resultados os autores sugeriram a existência de um fator pró-inflamatório liberado de linfócitos, em reações inflamatórias agudas.

Cordeiro et al. (1976, 1977) e Cunha et al. (1979) observaram que camundongos submetidos a infecção malárica apresentaram intensa leucocitose, concomitante com o desenvolvimento de edema pulmonar e hipotermia. Estes autores sugeriram que os leucócitos poderiam estar participando direta e/ou indiretamente na gênese e manutenção do edema pulmonar e hipotermia observados em camundongos Swiss-44 infectados com P. berghei.

O presente trabalho teve por objetivo ampliar estas últimas observações, na tentativa de melhor avaliar a participação de células da linhagem leucocitária, na malária.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS E ANESTESIA

No presente trabalho foram utilizados camundongos isogênicos da cepa B 10A e camundongos Swiss-44, de ambos os sexos, pesando entre 18 e 25 gramas. Os animais isogênicos foram fornecidos pelo biotério do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense e os camundongos Swiss-44 pelos biotérios da Universidade de Brasília e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Os animais, quando necessário, foram anestesiados com éter etílico.

2. AGENTE INFECTANTE

O agente infectante utilizado foi o Plasmodium berghei (Vincke & Lips, 1948), "cepa Pasteur" (Cunha, 1981). A manutenção da cepa de Plasmodium berghei ou a infecção de grupos experimentais foi feita colhendo-se sangue, por punção cardíaca, de animais que apresentavam parasitemia superior a 40%, contada em esfregaços de sangue. A seguir, cada animal recebeu 0,2 ml da solução de sangue infectado diluído em salina fisiológica, por via intraperitoneal, contendo, aproximadamente, 10^7 eritrócitos parasitados. Com este protocolo de infecção os animais morreram, na sua maioria, em sete dias. Cada parâmetro foi analisado, diariamente, até o sétimo dia da doença.

3. PARASITEMIA

Para a determinação da parasitemia foram realizados esfregaços de sangue em lâminas de vidro. O sangue para a confecção do esfregaço foi obtido através de um pequeno corte na extremidade da cauda dos animais. Os esfregaços foram fixados com metanol durante 2 a 3 minutos, corados pelo método de Giemsa e examinados ao microscópio, sob objetiva de imersão. Nos esfregaços foram contados de 500 a 1000 eritrócitos, em pelo menos cinco campos diferentes, expressando-se em percentagem o número de células parasitadas.

4. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS

As proteínas totais foram determinadas pelo método do biureto (método de Gornall, Bardawill & David, 1949). O sangue foi retirado por punção cardíaca, em seringa de 1 ml contendo 10% do volume de sangue a ser retirado de oxalato de sódio a 1%, e centrifugado a 1200 g durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,1 ml de plasma foi diluída em salina 0,9% para um volume final de 1 ml, ao qual foram adicionados 4 ml do reagente de biureto. Após um intervalo de 30 minutos foi realizada a leitura da densidade ótica dos tubos em um espectrofotômetro Beckman modelo DU, a um comprimento de onda de 540 nm.

5. 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 e em seguida exsanguinados, seccionando-se os vasos cervicais, e aberta a cavidade torácica. Os pulmões foram retirados, lavados rapidamente em salina 0,9% e colocados sobre papel de filtro para retirar o excesso de umidade. Em seguida, foram pesados em balança analítica.

6. TEMPERATURA CORPORAL

A temperatura corporal foi avaliada medindo-se a temperatura retal dos animais, através de um "thermistor" (teletermômetro NE-C - Ribeirão Preto-SP), inserindo-se a ponta da sonda (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 de 30 a 45 segundos para estabilização da leitura. A temperatura ambiente foi mantida entre 24 e 25°C durante as mensurações.

7. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

7.1 CONTAGEM TOTAL

Contagens do número de leucócitos totais foram realizadas em Câmaras de Neubauer, após diluição de amostras

tras de sangue de 1:20 com ácido acético a 2% (Líquido de Turk). As amostras de sangue foram obtidas através de punção intraocular do plexo orbital por meio de uma micropipeta de vidro (Herka, 25 microlitros). Os resultados foram expressos em número de leucócitos totais por milímetro cúbico de sangue.

7.2 CONTAGEM DIFERENCIAL

Para a contagem diferencial das células brancas foram preparados esfregaços sangüíneos e corados pelo método de Giemsa. Pela observação microscópica, através de objetiva de imersão, para cada 100 células, foi contado o número dos diferentes tipos de leucócitos, com auxílio de um contador de células digital marca Phoenix (Mod. EC 906-Brasil). Os resultados foram, então, expressos em percentagem.

8. TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM METHOTREXATO (MTX)

Grupos de animais controles e de animais submetidos à infecção com P. berghei, foram tratados com MTX, segundo o esquema abaixo:

	<u>P. berghei</u> ou salina									
	↓									
DIAS	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
	MTX	MTX	MTX		MTX		MTX		MTX	
	↑	↑	↑		↑		↑		↑	
DOSES (mg/kg)	2,0	2,0	2,0		2,0		2,0		2,0	

Os grupos de animais tratados com MTX e infectados receberam o inóculo de P. berghei (0,2 ml i.p., por animal, contendo 10^7 eritrócitos parasitados) no dia zero, logo após a injeção de MTX. O grupo de animais apenas tratados com MTX recebeu, neste mesmo dia, igual volume (0,2 ml) de salina.

O MTX foi diluído em NaOH 0,1 N e tamponado com Tampão TRIS 0,2 M, pH 7,8. As injeções foram dadas por via intraperitoneal.

9. ISOLAMENTO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS MONONUCLEARES

O isolamento de células esplênicas mononucleares foi realizado adaptando-se, para camundongos, a técnica proposta por Leme et al. (1976), como descrito abaixo:

- 1 - Retiraram-se os baços de camundongos anestesiados, colocando-os, imediatamente após, em um frasco contendo salina 0,9% estéril.
- 2 - Em uma placa de Petri contendo aproximadamente 5,0 ml de Salina Tampão Fosfato (STF), os baços foram pressionados com uma pinça até o estroma tornar-se esbranquiçado, obtendo-se assim, um homogenizado de polpa esplênica rico em eritrócitos e células mononucleares.
- 3 - Passou-se o homogenizado através de uma pe

neira de 0,2cm de diâmetro para um tubo de ensaio graduado, utilizando-se pequenas câmaras de filtração para retirar os fragmentos de baço que não foram triturados. Completou-se o volume do tubo até a marca de 10 ml com STF.

- 4 - Centrifugou-se o "pool" de células obtido a 500g durante 5 minutos, a temperatura de 10°C. O sobrenadante foi desprezado.
- 5 - Após a adição de 5 ml de STF, homogenizou-se o precipitado com ligeira agitação do tubo. Colocou-se lã de vidro numa seringa de 20 ml, até a altura de 1 ml. Lavou-se a coluna de lã de vidro com STF e, em seguida, passou-se o homogenizado através da mesma. A seguir, lavou-se a referida com STF até que a lã de vidro ficasse brancamente. Este procedimento foi realizado com a finalidade de reter macromoléculas e os eventuais monócitos presentes na suspensão. O volume do tubo coletor foi completado até a marca de 10 ml. Em seguida, foi feita uma centrifugação, a 500g durante 5 minutos a uma temperatura de 10°C, e desprezou-se o sobrenadante.
- 6 - Homogenizou-se o precipitado com 0,5 ml de STF e completou-se o volume para 1 ml.
- 7 - Prosseguiu-se com a realização de um cho-

- que hipotônico que consistiu no seguinte:
- Adicionou-se ao tubo que continha a suspensão de células, 3 ml de água destilada;
 - Agitou-se o tubo durante 20 segundos, tempo durante o qual os eritrócitos se rompem, enquanto que as células mononucleares permanecem íntegras;
 - Após os 20 segundos, adicionou-se 1 ml de salina 3,6% à suspensão, com a finalidade de se retornar à isotonicidade do meio;
 - Completou-se com STF o volume do tubo para 10 ml.
- 8 - A suspensão foi submetida a nova centrifugação, a 500g durante 5 minutos, e o sobrenadante desprezado. O precipitado assim obtido, contendo aproximadamente 95% de células mononucleares, das quais 90% eram linfócitos, foi submetido a um processo de lavagem com STF por três vezes.
- 9 - Finalmente, as células foram ressuspensas em 2 ml de STF e sua viabilidade testada usando-se o corante Eosina Y a 1%. O teste de viabilidade mostrou que 90% das células mononucleares eram viáveis após o processo de isolamento.

10. ENSAIOS DE "REPOSIÇÃO" DE CÉLULAS MONONUCLEARES ESPLÊNICAS (CME) EM CAMUNDONGOS B10A

10.a) CÁLCULOS REALIZADOS

Em todos os ensaios de "reposição" o número de CME a ser injetado, por animal receptor, foi calculado como se segue: Inicialmente, foram feitas as contagens: a) do número de CME obtidas pela técnica de isolamento destas células (contadas em câmara de Neubauer, após diluição de uma amostra do "pool" de células de 1:20, com ácido acético a 2%), corrigindo-se o valor encontrado com a percentagem obtida pelo teste de viabilidade e b) de leucócitos totais e dos diferentes tipos de células da linhagem leucocitária (contagem diferencial) dos animais que iriam receber a injeção de CME.

Como nestes experimentos os linfócitos foram as células mononucleares predominantes no leucograma dos animais (e também no "pool" de CME obtido), foi considerado, no(s) dia(s) de "reposição", o número de linfócitos, em média, de cada grupo experimental, para o cálculo de quantas CME deveriam ser injetadas. Estipulou-se que os animais deveriam receber uma injeção de CME suficiente para que apresentassem, em média, aproximadamente 10^4 células mononucleares (neste caso linfócitos) / mm^3 de sangue. Este valor foi tomado como referência, em função dos experimentos realizados em camundongos Swiss-44 infectados com P. berghei que, no 6º dia de infecção,

apresentaram linfocitose mais intensa, com um número mé dio de 13.000 linfócitos / mm³ de sangue (ver em resultada dos, Gráfico 5-B). Além disto, foi considerado, para os cálculos, que camundongos tinham, aproximadamente, 3 ml de sangue.

As injeções das suspensões de CME foram feitas através do plexo orbital. Como o volume da injeção nunca ultrapassou a 0,15 ml, faziam-se diluições prévias se gundo a necessidade.

10.b) GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram definidos, dependendo do animal doador de CME, do animal receptor dessas células e do período de acompanhamento do ensaio, os seguintes grupos experi mentais:

I) MTX + REP - "Reposição" de CME de doadores normais em animais leucopênicos, isto é, pré-tratados com MTX. Seguiu-se o esquema de injeções adotado por Cunha et al. (1979), no qual os animais receberam injeções de CME nos dias 1^o e 5^o de infecção malárica. Neste grupo foram analisados, durante 7 dias, os seguintes parâmetros: temperatura corporal, relação peso do pulmão / peso corporal e os números de leucócitos totais, de neutrófilos e linfócitos / mm³ de sangue.

II) Pb + MTX + REP - "Reposição" de células mo nonucleares esplênicas de doadores normais em animais leucopênicos e infectados com P. berghei. O esquema de injeções de CME, o período de acompanhamento dos animais

e os parâmetros analisados foram os mesmos do GRUPO I.

III) NOR + REPin - "Reposição" de CME de doadores infectados (7º dia de infecção) em animais normais. Neste grupo os animais receberam injeção única de CME e foram analisados o número de leucócitos totais, de neutrófilos, de linfócitos e a relação peso do pulmão/peso corporal por um período de 24 horas, nos seguintes intervalos de tempo: 1ª, 2ª, 3ª, 6ª e 24ª hora após a reposição.

11. REAGENTES E SOLUÇÕES

11.a) REAGENTE DE BIURETO:

Acrescentaram-se a um balão volumétrico de 1000 ml, 1,5g de sulfato de cobre penta-hidratado e 6,0g de tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hidratado, adicionando-se 500 ml de água destilada, com agitação constante. Após a dissolução, acrescentaram-se 300 ml de hidróxido de sódio a 10%, lentamente, e completou-se o volume, com água destilada.

Para a obtenção da solução de hidróxido de sódio a 10%, preparou-se, na véspera, uma solução estoque de hidróxido de sódio a 70%. Esta solução foi deixada em repouso por 24 horas. Em seguida, decantou-se o sobrenadante límpido e a partir desta solução inicial, preparou-se a solução de hidróxido de sódio a 10%.

11.b) SOLUÇÃO DE TURK:

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.

11.c) SOLUÇÃO SALINA TAMPÃO FOSFATO (STF)

1 - Solução estoque I (em g/l)

Cloreto de sódio	81,82
------------------	-------

2 - Solução estoque II (em g/l)

A) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,58
---	------

B ₁) Na_2HPO_4	26,50
--	-------

B ₂) Na_2HPO_4 anidrido	10,50
---	-------

Solução de trabalho - Utilizou-se 100 ml tanto da solução 1 como da solução 2 (obtida pela mistura de A com B₁ ou B₂). As proporções foram para 1 litro de solução.

12. DROGAS E REAGENTES

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

- Ácido acético (Reagen)
- Álcool metílico (Merck)
- Cristal violeta (Merck)
- Éter anestésico (Rhodia)
- Hidróxido de sódio (Reagen)
- Methotrexate sódico (Lederle)
- Óleo de imersão (Merck)
- Solução de Giemsa (Merck)
- Soro albumina bovina (Sigma)
- Sulfato de cobre penta-hidratado (Merck)
- Tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hi
dratado (Reagen)
- TRIS-hidroximetilaminometano (Sigma)
- Vaselina (Reagen)

13. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Aos resultados obtidos foram aplicados tratamentos estatísticos (Snedecor, 1963), para a determinação do desvio padrão de média (DPM) e da significância entre grupos (teste "t" de Student, para amostras não pareadas).

RESULTADOS

Camundongos Swiss-44 ou B 10A apresentaram, no decorrer de 7 dias de infecção malárica, aumento progressivo do número de hemácias parasitadas (figura 1). Como pode ser observado, os níveis parasitêmicos nessas duas espécies de roedores foram bastante semelhantes, chegando, no 7º dia de infecção, a valores em torno de 60% de células parasitadas. O tratamento dos animais, quer seja Swiss-44 ou B 10A, com methotrexato (MTX) causou redução significativa da parasitemia a partir do 4º dia de infecção. Entretanto, é necessário ressaltar que, embora essa redução tenha significado importante, os animais alcançaram, no 7º dia de infecção, níveis de parasitemia acima de 20%, níveis estes equivalentes aos encontrados no 5º dia de infecção em animais apenas infectados com P. berghei (Pb). Observa-se ainda na figura 1-B que a transferência de células mononucleares esplênicas (CME) de doadores isogênicos normais a animais isogênicos infectados e tratados com MTX causou uma redução ainda mais acentuada da parasitemia destes animais, no 6º e 7º dias de infecção.

Na tabela 1 pode ser observado que nem a infecção com Pb, nem o tratamento de camundongos Swiss-44, normais ou infectados, com MTX produziram alterações significativas nos níveis plasmáticos de proteínas totais, quando comparados aos valores obtidos em animais normais.

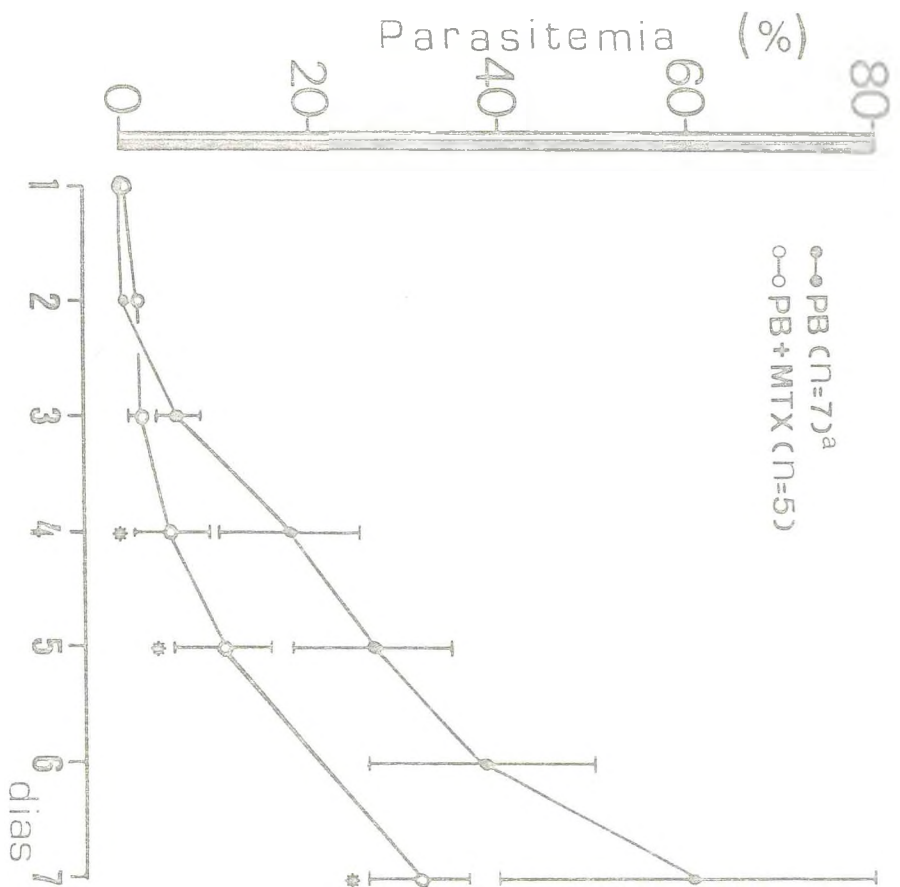
A infecção malárica em camundongos Swiss-44 ou B 10A produziu alterações significativas na relação Peso

do Pulmão (PP) / Peso Corporal (PC) destes animais (figura 2). Os animais apresentaram aumento significativo e progressivo da relação de Staub com o decorrer da doença, indicando uma instalação progressiva e intensa de edema pulmonar (figuras 2-B e 2-D). Os animais Swiss-44 apresentaram, a partir do 3º dia de infecção, valores maiores da relação PP/PC, quando comparados aos animais B 10A. O tratamento dos animais com o agente leucopênico, MTX, não produziu importantes alterações na relação de Staub de animais normais (figuras 2-A e 2-C), mas inibiu totalmente o desenvolvimento de edema pulmonar em camundongos infectados (figuras 2-B e 2-D).

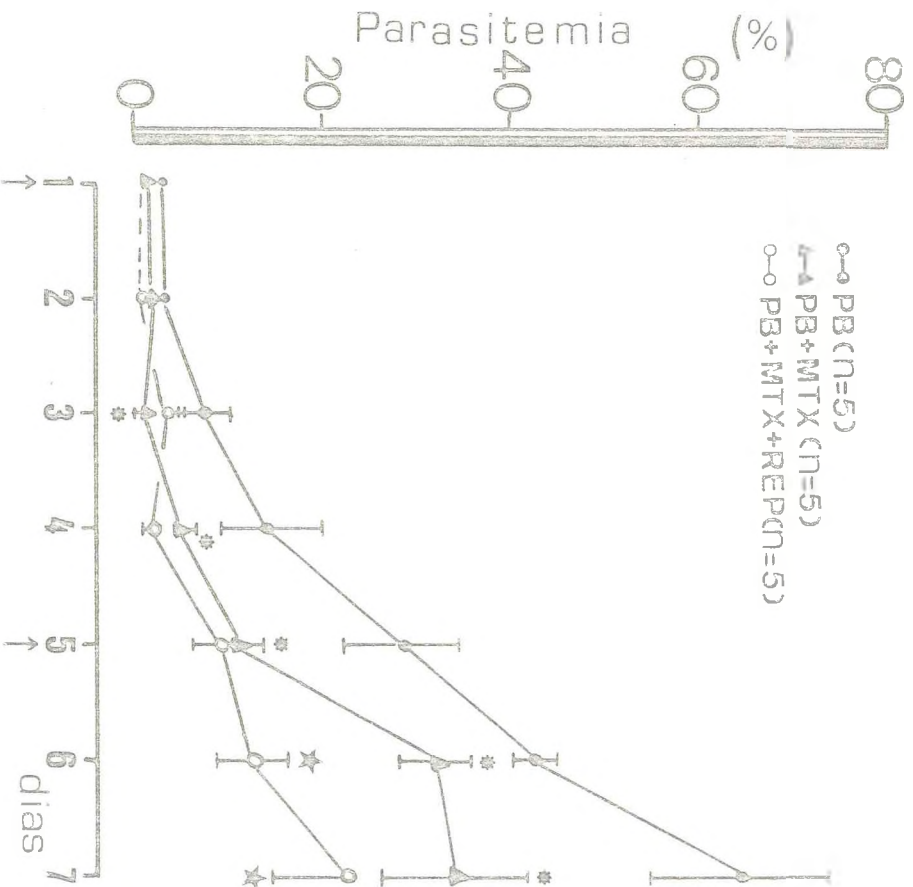
A figura 3 mostra a variação de temperatura corporal, em relação a animais normais, de camundongos (1) tratados com MTX; (2) infectados com Pb e (3) infectados com Pb e tratados com MTX. Pode-se observar que a infecção malárica causou uma profunda hipotermia, nas duas espécies animais estudadas. Em animais Swiss-44 a queda de temperatura corporal foi progressiva, a partir do 3º dia, e máxima, cerca de 3,5 graus abaixo da temperatura de animais normais, no 7º dia de infecção (figura 3-A). Já em animais isogênicos a hipotermia se instalou do 4º para o 5º dia de infecção, com uma queda de aproximadamente 7 graus, e permaneceu praticamente inalterada até o 7º dia da doença, onde a queda na temperatura corporal foi em torno de 6 graus centígrados, em relação ao grupo de animais normais (figura 3-B). O tratamento dos animais com MTX não produziu alterações significativas na temperatura corporal de animais normais, mas inibiu, de

FIGURA 1 - Níveis de parasitemia (%) em camundongos Swiss-44 (1-A) e B 10A (1-B) infectados com B. berghei e tratados com MTX e infectados com o plasmódio. A figura 1-B mostra, ainda, o efeito da reposição de CME de doadores isogênicos normais sobre os níveis de parasitemia de animais B 10A infectados com P. berghei e tratados com MTX.

- As barras verticais indicam \pm DP. Em alguns pontos foram colocados ou o desvio positivo ou o desvio negativo, apenas para facilitar a ilustração.
- a - representa o número de animais utilizados, em cada ponto experimental.
- * - diferença entre médias, em relação ao grupo de animais infectados, estatisticamente significativa (* $p < 0,05$).
- ☆ - diferença entre médias, em relação ao grupo de animais infectados e tratados com MTX, estatisticamente significativa (☆ $p < 0,005$).
- As setas verticais indicam os dias de reposição de CME de doadores isogênicos normais em camundongos B 10A infectados e tratados com MTX.



I(A)



I(B)

TABELA 1 - Níveis de proteínas totais (g%) no plasma de camundongos Swiss-44 tratados com methotrexato, infectados com P. berghei e tratados com methotrexato e infectados com o P. berghei.

DIAS	TRATAMENTOS		
	METHOTREXATO	P. berghei	METHOTREXATO + P. berghei
1	6,9 ± 1,1 ^a (3) ^b	6,7 ± 1,5 (3)	5,4 ± 1,2 (3)
2	5,3 ± 1,0 (3)	6,8 ± 1,4 (3)	5,8 ± 0,2 (3)
3	6,4 ± 1,2 (3)	6,0 ± 0,6 (3)	6,4 ± 0,5 (3)
4	5,7 ± 0,6 (3)	6,9 ± 0,8 (3)	5,2 ± 0,2 (3)
5	6,4 ± 0,2 (5)	4,8 ± 0,7 (5)	6,8 ± 1,2 (3)
6	6,4 ± 0,5 (5)	5,8 ± 0,8 (5)	6,6 ± 0,7 (5)
7	6,4 ± 0,7 (5)	5,2 ± 0,3 (6)	6,0 ± 0,3 (5)

O nível de proteínas plasmáticas totais em camundongos Swiss-44 normais foi de 5,8 ± 0,8 (9) - média ± DPM.

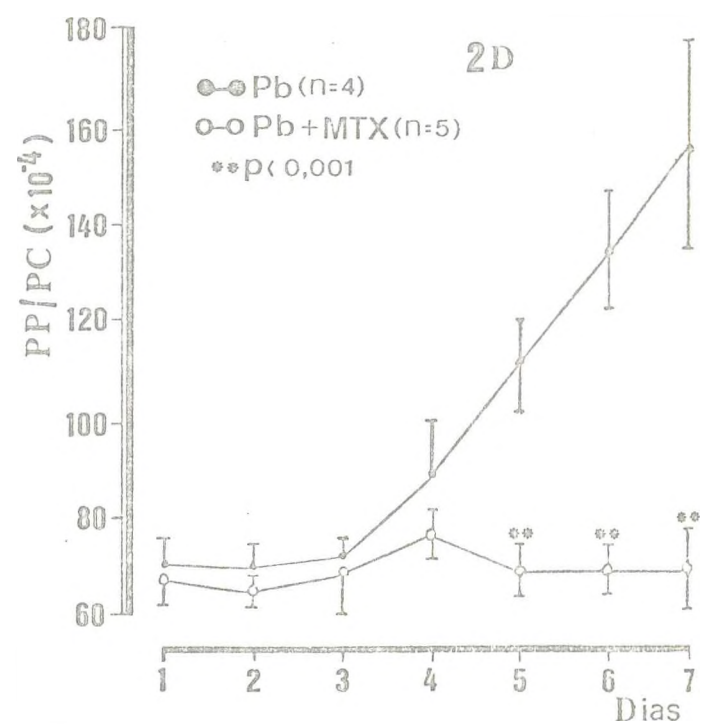
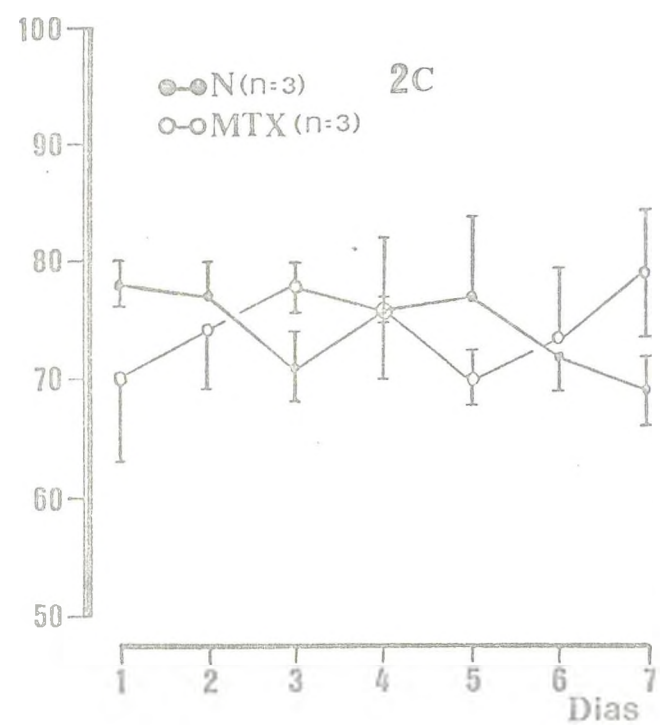
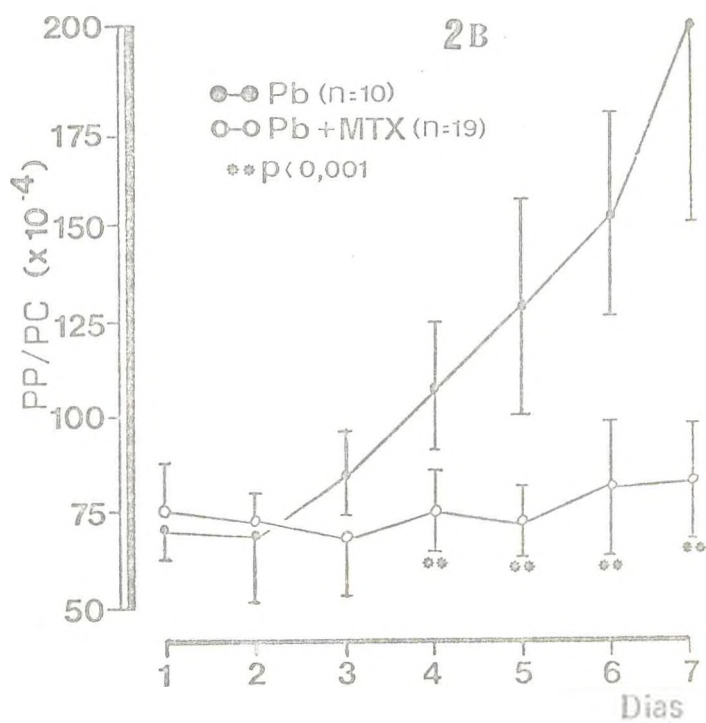
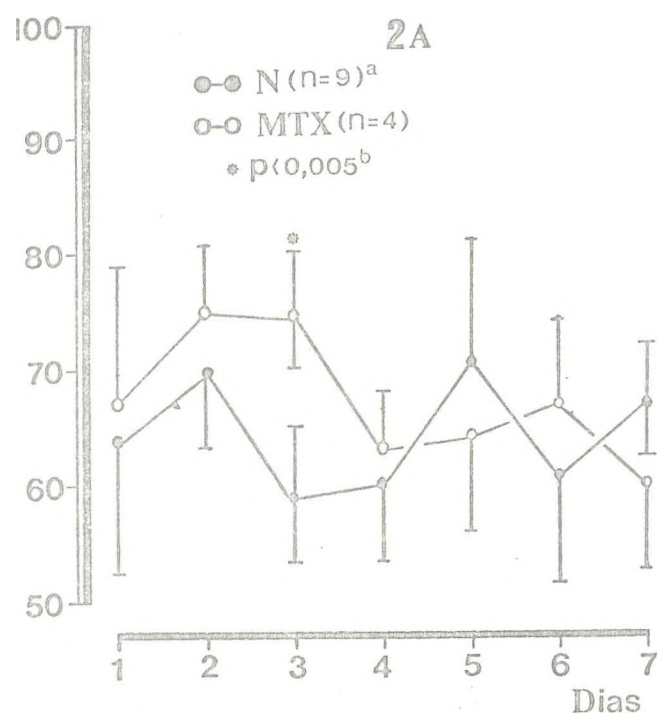
a - representa a média ± desvio padrão da média

b - número de animais utilizados por experimento

FIGURA 2 - Valores da relação Peso do pulmão/Peso Corporal (PP/PC) de camundongos Swiss-44 e B 10A normais; tratados com methotrexato (MTX); infectados com P. berghei e infectados com o plasmódio e tratados com MTX, durante sete dias de acompanhamento. (2-A) Swiss - 44 normais (N) e tratados com MTX; (2-B) Swiss -44 infectados com P. berghei (Pb) e tratados com MTX (Pb + MTX); (2-C) B 10A normais (N) e tratados com methotrexato (MTX); e (2-D) B 10A infectados com P. berghei (Pb) e infectados com Pb e tratados com MTX (Pb + MTX). As barras verticais indicam \pm DP. Em alguns pontos foram colocados ou o desvio positivo ou o desvio negativo, apenas para facilitar a ilustração.

a - os números entre parênteses representam o número de animais utilizados em cada ponto experimental.

b - níveis de significância (p) obtidos pela aplicação de teste "t" de Student para amostras não pareadas.



forma bastante acentuada, a hipotermia de animais Swiss-44 infectados e, totalmente, as alterações de temperatura observadas em camundongos B 10A infectados com Pb (figuras 3-A e 3-B).

Leucocitose progressiva foi observada em animais infectados com Pb, no decorrer da doença (figura 4). Animais Swiss-44 apresentaram uma leucocitose um pouco mais intensa do que a apresentada por camundongos B 10A, atingindo valores acima de 20.000 leucócitos/mm³, no 7º dia de infecção (figuras 4-B e 4-D). O tratamento dos animais com MTX reduziu de forma significativa o número de leucócitos circulantes de animais normais (figuras 4-A e 4-C) e inibiu, totalmente, o desenvolvimento de leucocitose em animais infectados (figuras 4-B e 4-D).

No leucograma dos animais as células predominantes foram neutrófilos e linfócitos. As figuras 5 e 6 mostram, respectivamente, o número destes leucócitos em animais Swiss-44 e B 10A (1) normais; (2) tratados com MTX; (3) infectados com Pb e (4) infectados com o plasmódio e tratados com MTX. Pode-se observar que, em animais Swiss-44 normais, houve um predomínio nítido do número de linfócitos sobre o número de neutrófilos, nos sete dias analisados (figura 5). Entretanto, nos animais isogênicos, excetuando-se o 1º dia, os números dessas células se equivaleram nos demais dias observados (figura 6). Pelos resultados obtidos em animais Swiss-44 pode-se observar que o tratamento com o MTX foi mais efetivo em reduzir o número de linfócitos circulantes, embora reduções significativas do número de neutrófilos foram ob

FIGURA 3 - Variação da temperatura corporal de camundongos Swiss-44 e B 10A tratados com methotrexato (MTX); infectados com P. berghei (Pb) e infectados com Pb e tratados com MTX (Pb + MTX), durante sete dias de acompanhamento. (3-A) experimentos realizados em animais Swiss-44 e (3-B) experimentos realizados em B 10A.

- as barras verticais indicam o desvio padrão (DP).

a - os números entre parênteses indicam o número de animais utilizados em cada ponto experimental.

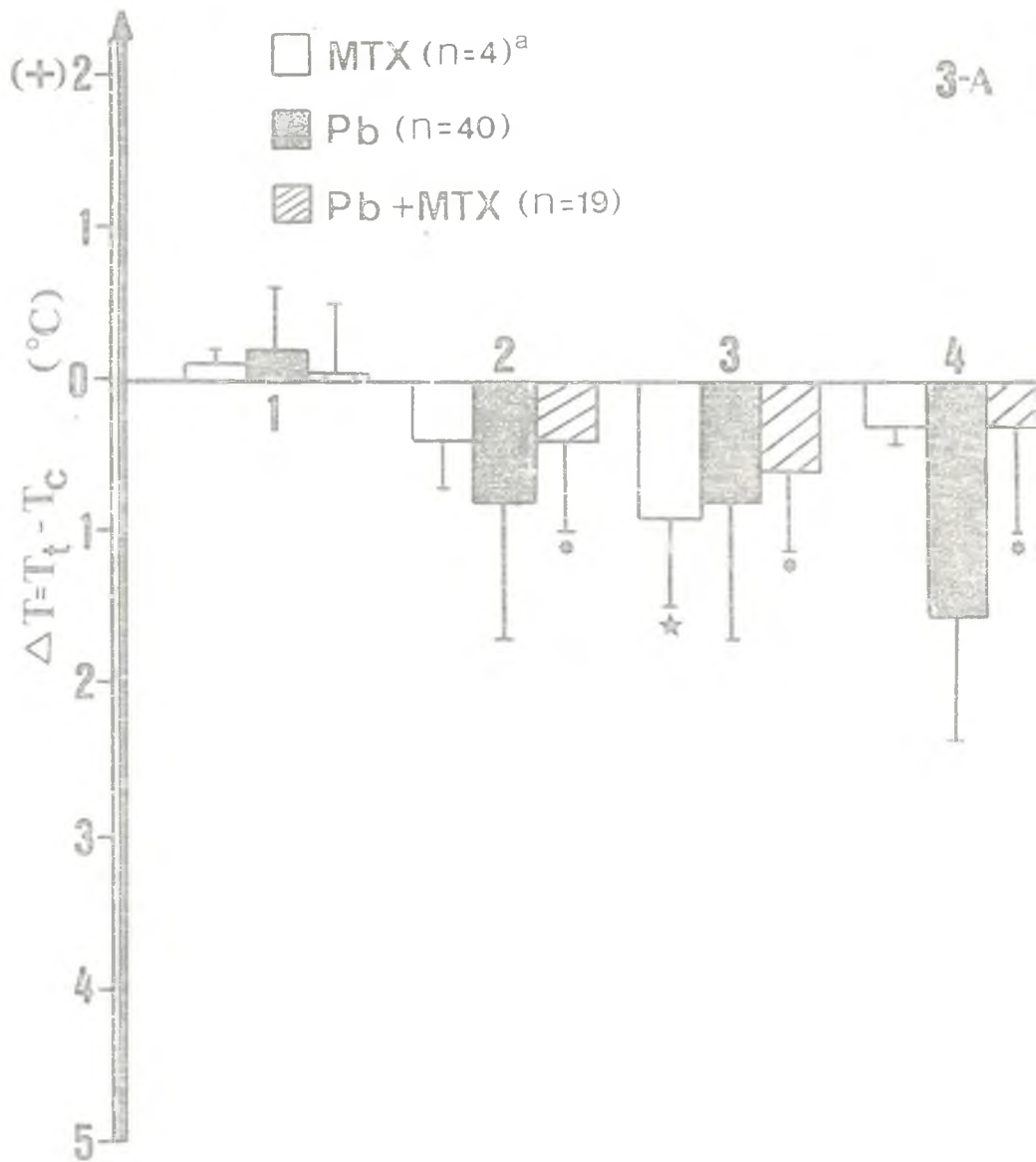
★ - diferença de médias, em relação ao grupo controle, estatisticamente significativa (★ $p < 0,05$).

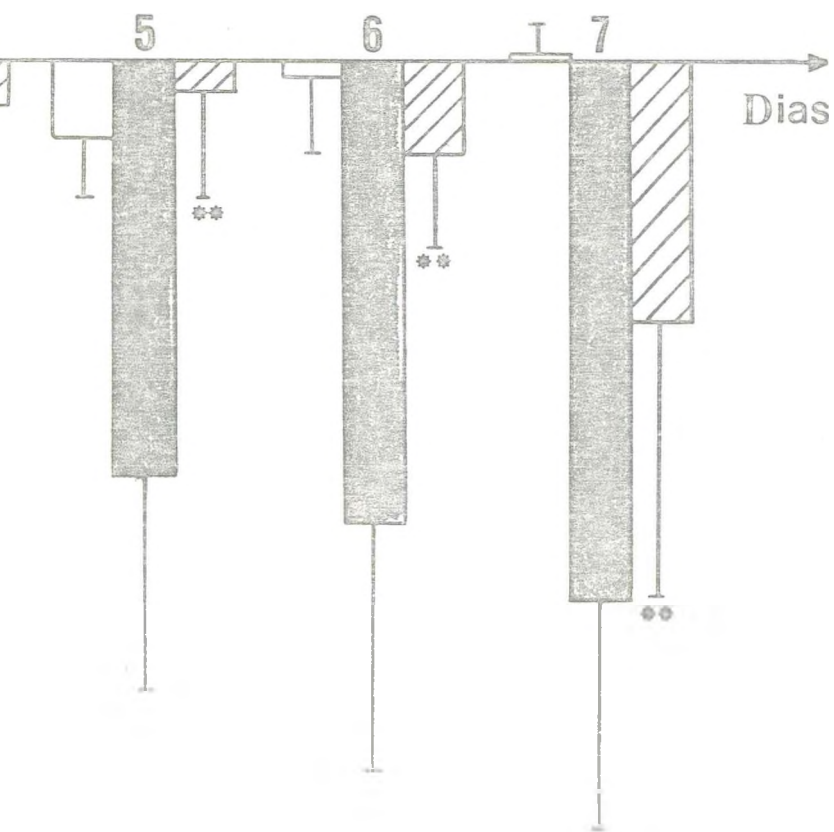
* - diferença de médias, em relação ao grupo infectado com Pb, estatisticamente significativa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

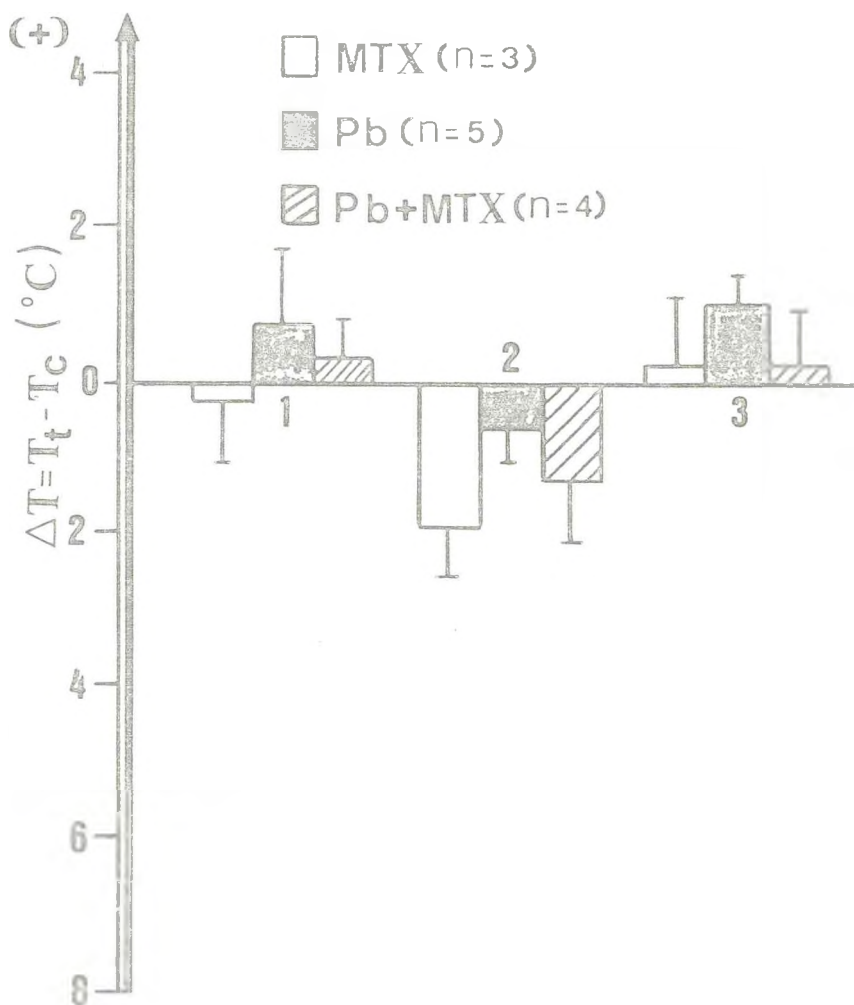
A temperatura ambiente foi mantida entre 24-25°C.

As temperaturas de camundongos Swiss-44 e B 10A controles foram, respectivamente, $36,4 \pm 0,7$ (21) e $37,4 \pm 1,2$ (21) - (média \pm desvio padrão da média).

ΔT - Temperatura de animais tratados - Temperatura de animais controles.







3-B

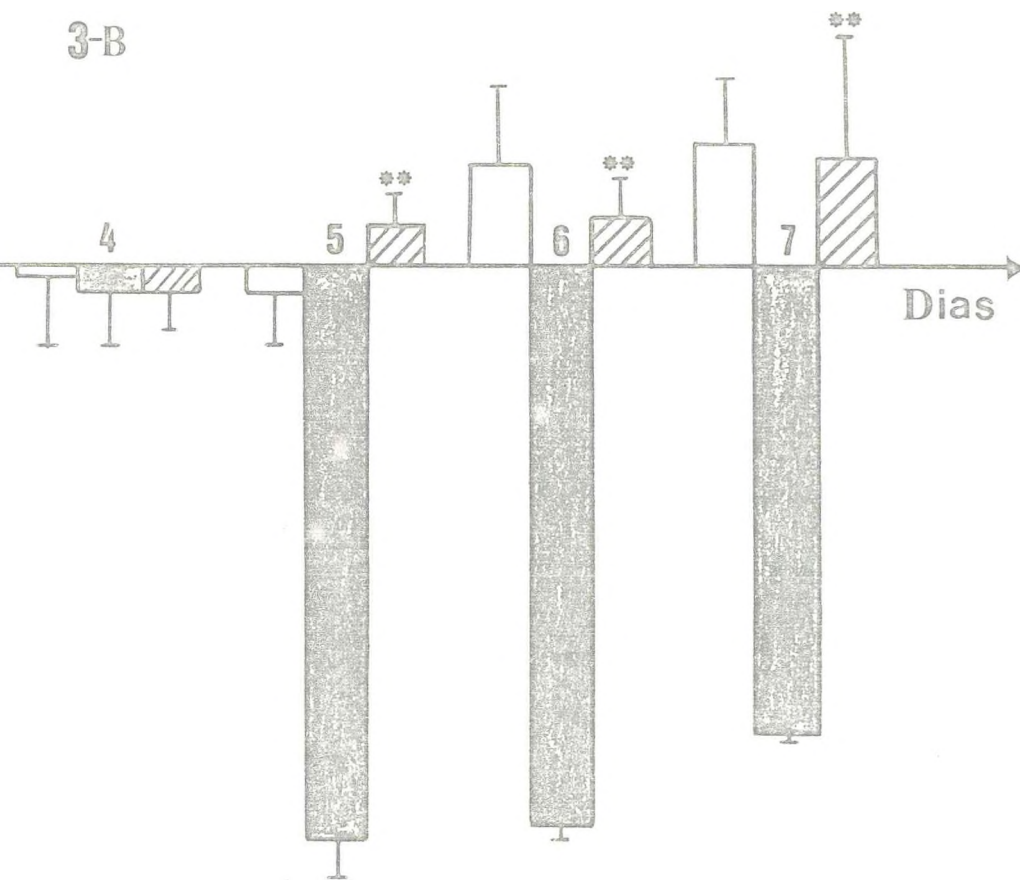
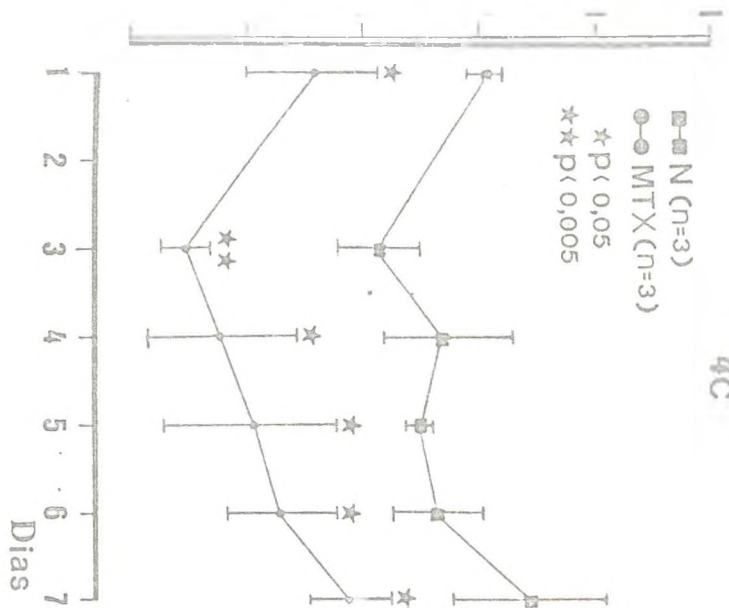


FIGURA 4 - Número de leucócitos/mm³ de sangue de camundongos Swiss-44 e B 10A normais; tratados com methotrexato; infectados com P. berghei e infectados e tratados com methotrexato, durante sete dias de acompanhamento. (4 - A) Swiss-44 normais (N) e tratados com methotrexato (MTX); (4-B) Swiss-44 infectados com P. berghei (Pb) e infectados com Pb e tratados com MTX (Pb + MTX); (4-C) B 10A normais (N) e tratados com methotrexato (MTX) e (4-D) B 10A infectados com P. berghei (Pb) e infectados com Pb e tratados com MTX (Pb + MTX). As barras verticais indicam \pm DP. Em alguns pontos foram colocados ou o desvio positivo ou o desvio negativo, apenas para facilitar a ilustração.

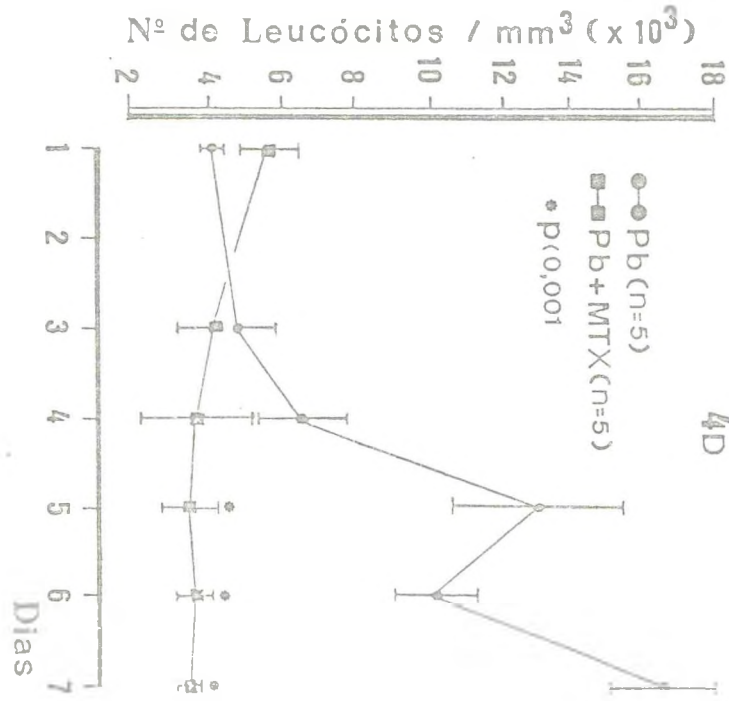
a - representa o número de animais utilizados em cada ponto experimental.

b - níveis de significância (p) obtidos pela aplicação do teste "t" de Student para amostras não pareadas.

4C



4D



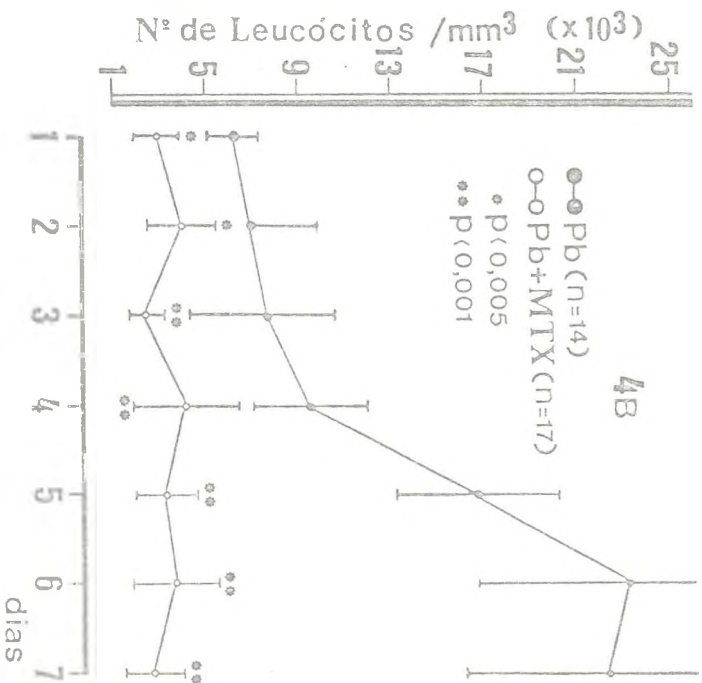
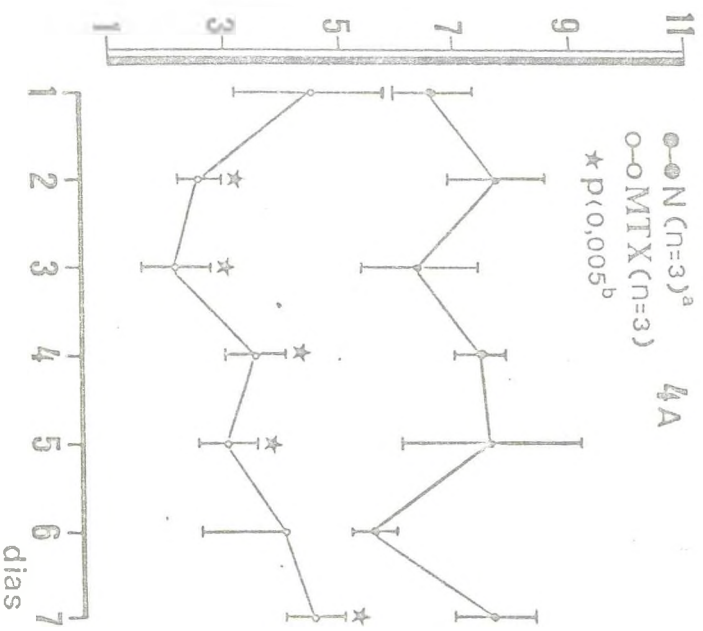


FIGURA 5 - Número de neutrófilos e linfócitos circulantes em camundongos Swiss-44 normais; tratados com methotrexato (MTX); infectados com P. berghei (Pb) e infectados com Pb e tratados com MTX (Pb + MTX).

- As barras verticais indicam \pm DP.

a - os números entre parênteses indicam o número de animais utilizados em cada ponto experimental.

★ - diferença de médias, em relação ao grupo controle, estatisticamente significativa (★ $p < 0,05$).

* - diferença de médias, em relação ao grupo infectado com Pb, estatisticamente significativa (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$).

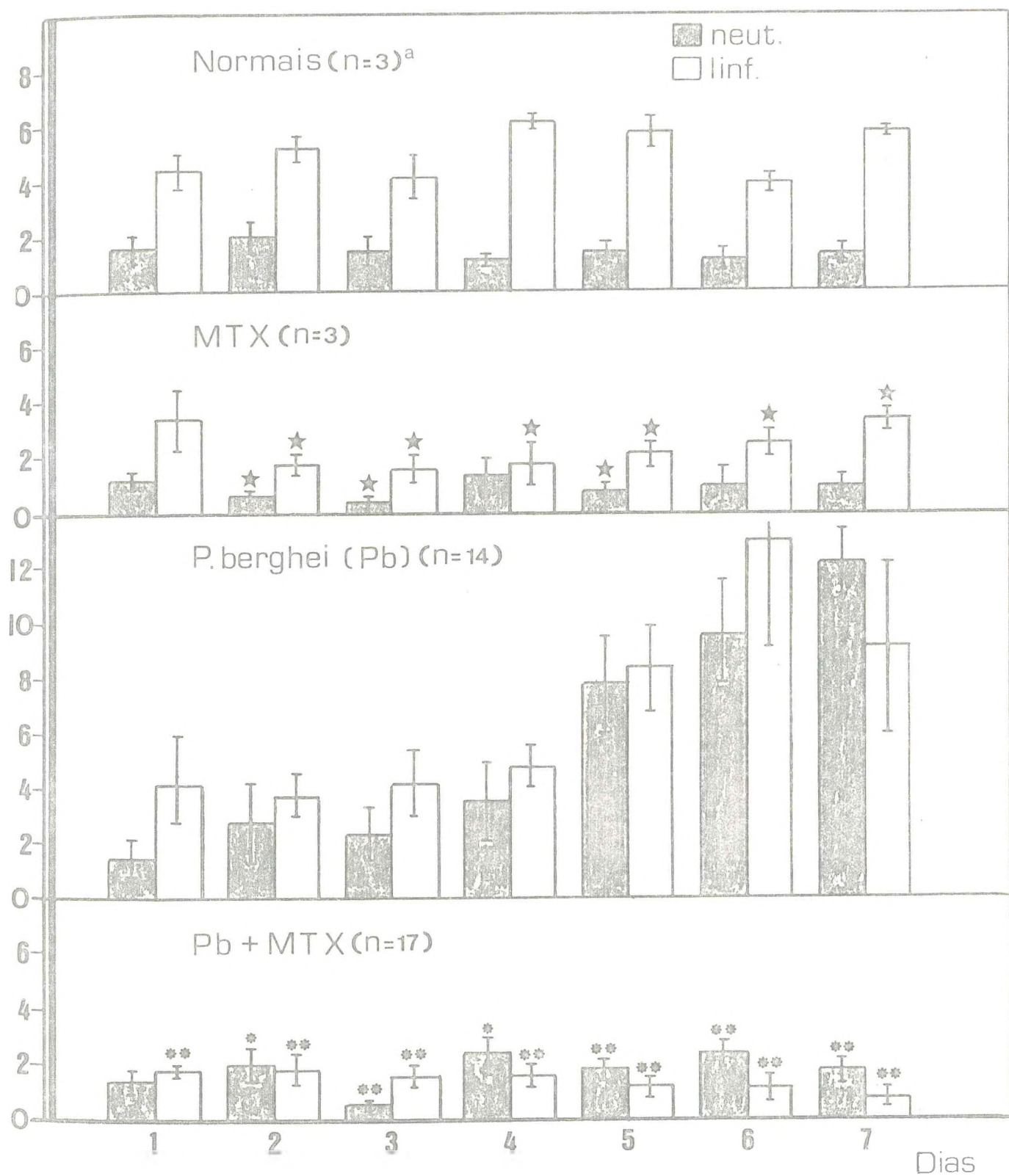


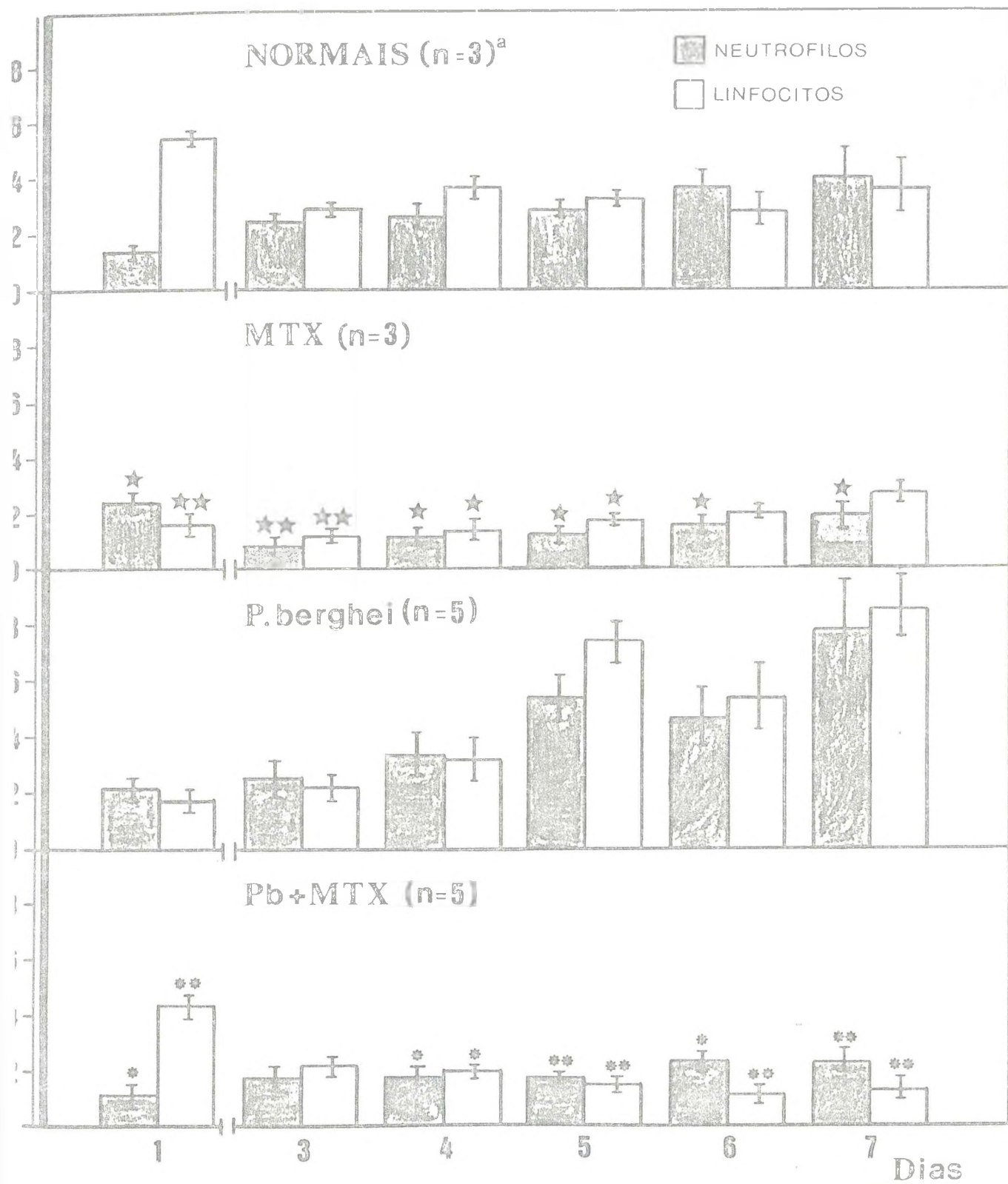
FIGURA 6 - Número de neutrófilos e linfócitos circulantes em camundongos B 10A normais; tratados com methotrexato (MTX); infectados com P. berghei (Pb) e infectados com Pb e tratados com MTX (Pb + MTX).

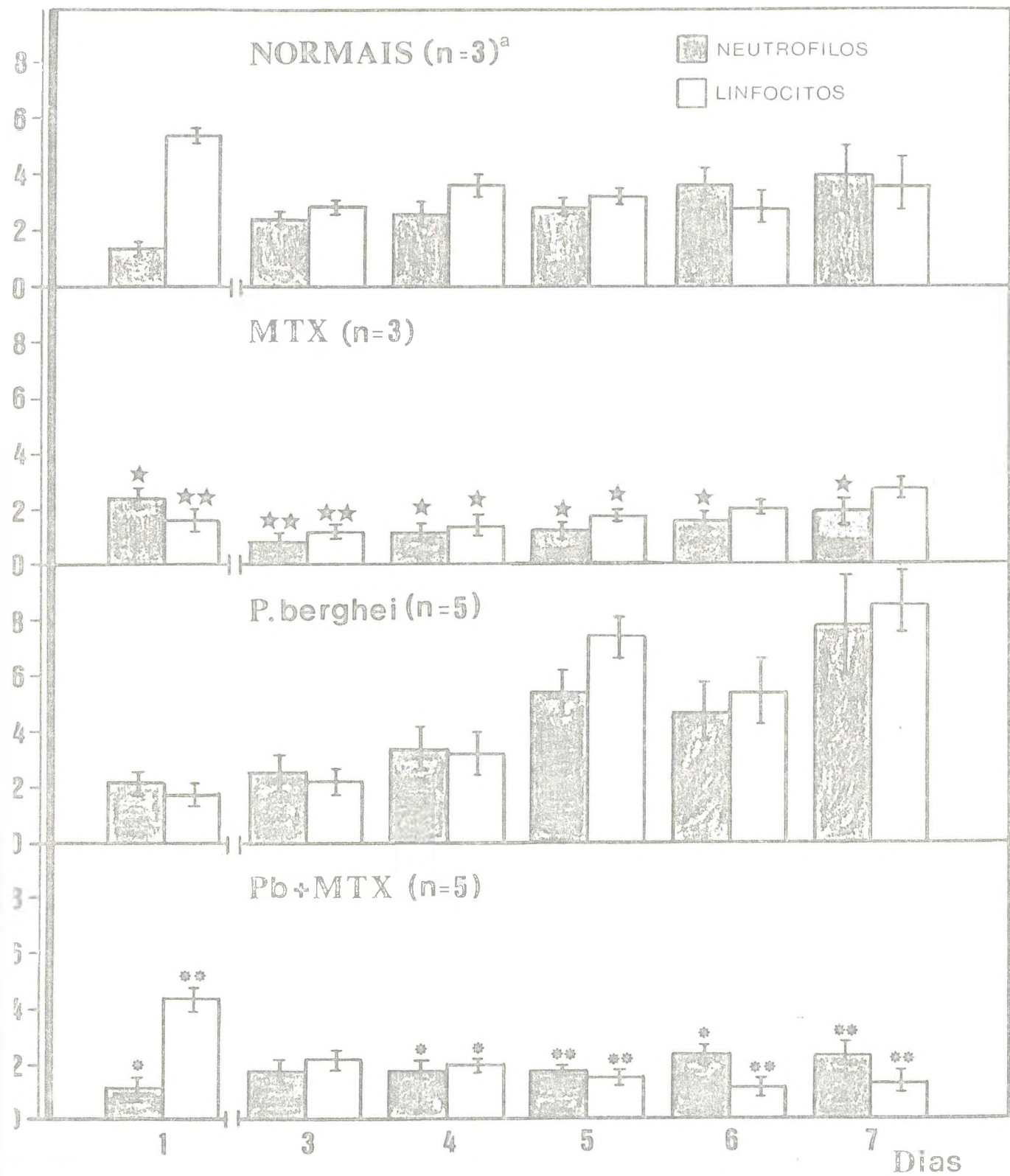
- As barras verticais indicam + DP.

a - número de animais usados em cada ponto experimental.

★ - diferença de médias, em relação ao grupo controle, estatisticamente significativa (★ $p < 0,05$ e★★ $p < 0,001$).

* - diferença de médias estatisticamente significativa (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$), em relação ao grupo infectado com Pb.





servadas nos 2º, 3º e 5º dias de acompanhamento (figura 5). Já em animais isogênicos o tratamento com MTX reduziu tanto o número de neutrófilos como de linfócitos, em bora as reduções no número de linfócitos circulantes observados no 6º e 7º dias de acompanhamento não tenham se mostrado estatisticamente significantes (figura 6). Animais Swiss-44 ou B 10A infectados com Pb apresentaram neutrofilia e linfocitose e o tratamento destes animais com MTX foi capaz de inibir, totalmente, estas alterações (figuras 5 e 6).

A transferência, nos dias equivalentes aos 1º e 5º dias de infecção, de CME de doadores normais à camundongos B 10A (1) tratados com MTX ou (2) infectados com Pb e tratados com MTX não alterou, de forma significativa, a relação PP/PC (figuras 7-A e 7-B) ou a temperatura corporal (figuras 8-A e 8-B), destes animais.

A figura 9 mostra o efeito da reposição de CME de doadores normais sobre o número de leucócitos circulantes de camundongos isogênicos (1) tratados com MTX e (2) infectados com Pb e tratados com o agente leucopênico. Pode-se observar que animais tratados com MTX que receberam a reposição de CME apresentaram, em média, valores, do 3º ao 6º dias de acompanhamento, pouco acima do número de leucócitos circulantes, em relação aos animais apenas tratados com MTX, embora somente o valor encontrado no 3º dia de acompanhamento tenha se mostrado estatisticamente diferente ($p < 0,01$; figura 9-A). No 7º dia de acompanhamento o número de leucócitos baixou, de

FIGURA 7 - Efeito da reposição de células mononucleares esplênicas (CME) sobre a relação Peso do Pulmão/Peso Corporal (PP/PC) de camundongos B 10A tratados com MTX (7-A) e infectados com P. berghei e tratados com MTX (7-B), durante sete dias de acompanhamento.

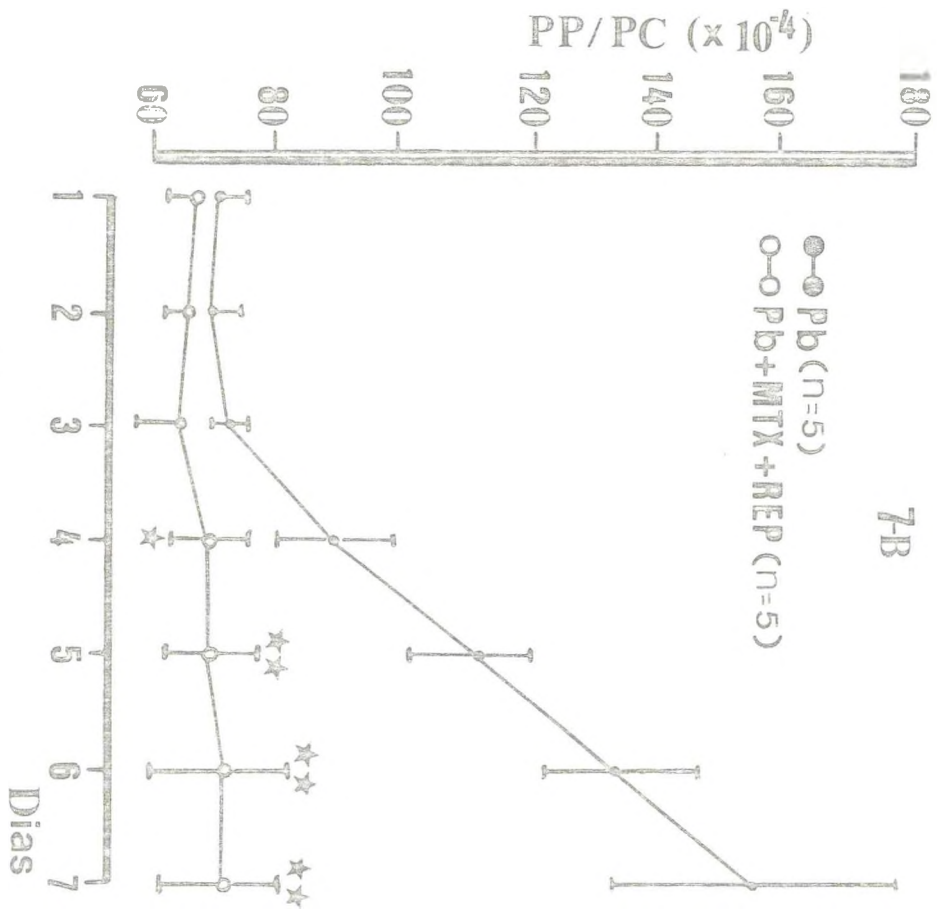
- As barras verticais indicam \pm DP. Em alguns pontos foram colocados ou o desvio positivo ou o desvio negativo, apenas para facilitar a ilustração.

a - representa o número de animais utilizados por cada ponto experimental.

★ - diferença de médias, em relação ao grupo de animais infectados com Pb, estatisticamente significativa (★ $p < 0,05$ e ★★ $p < 0,001$).

- os animais receberam duas injeções de CME: no 1º e 5º dias.

7-B



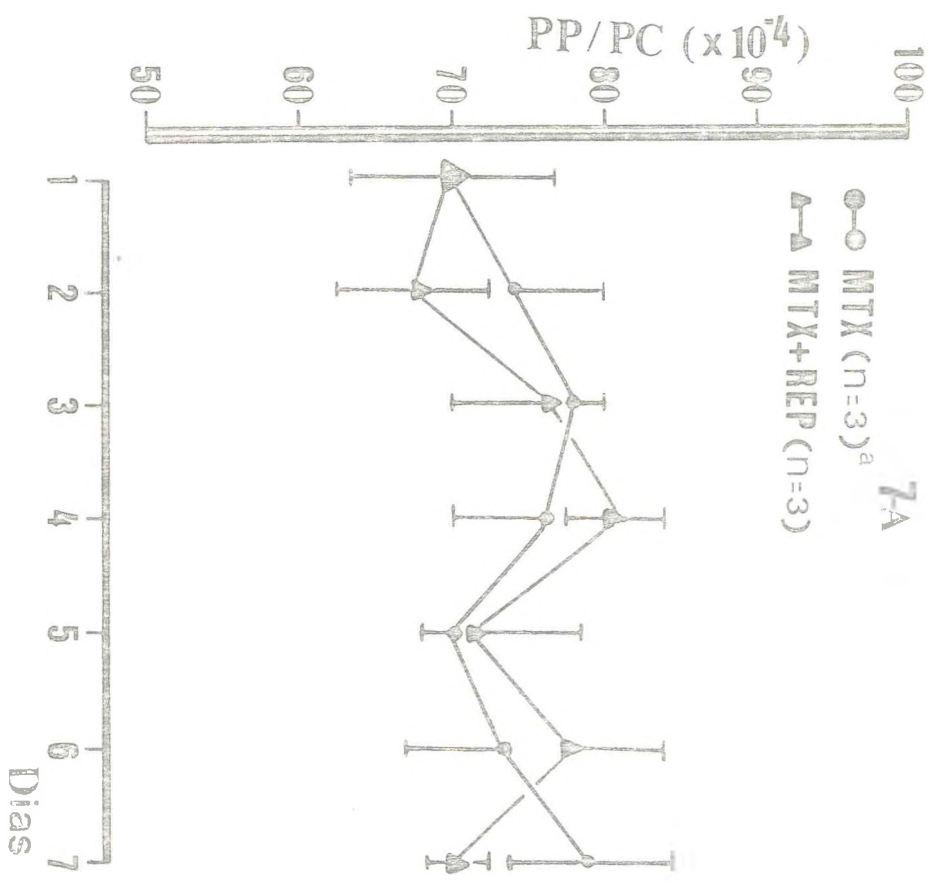


FIGURA 8 - Efeito da reposição de células mononucleares esplênicas sobre a variação de temperatura corporal, em relação a animais normais, de camundongos B 10A tratados com MTX (8-A) e infectados com P. berghei e tratados com MTX (8-B), durante sete dias de acompanhamento.

- As barras verticais indicam o DP.

a - representa o número de animais utilizados em cada ponto experimental.

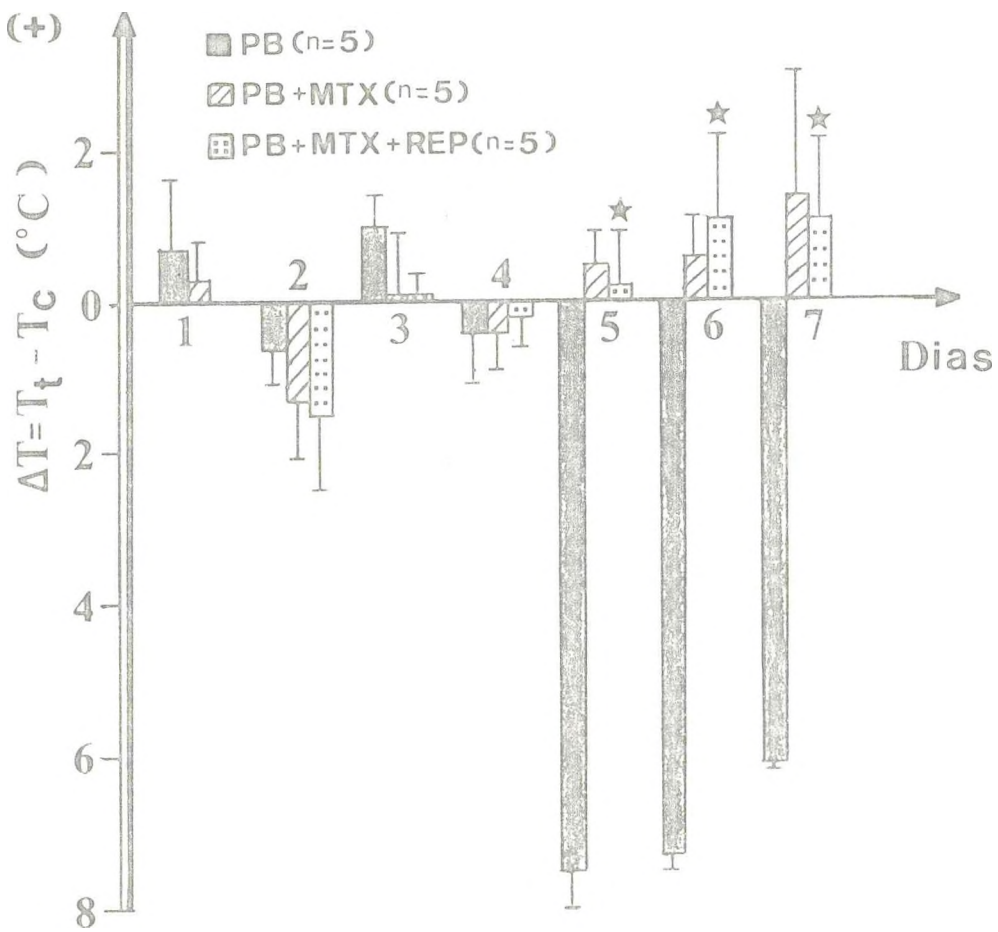
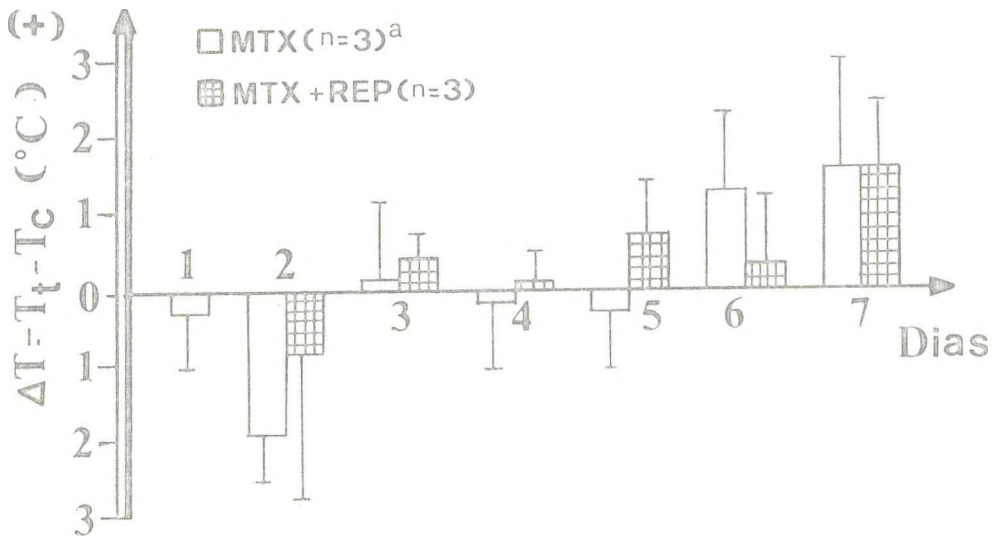
★ - diferença de médias, em relação ao grupo de animais infectados, estatisticamente significativa (★ $p < 0,001$).

- os animais receberam duas injeções de CME: no 1º e 5º dias.

- a temperatura ambiente foi mantida entre 24--25°C.

- a temperatura dos animais controles foi de $37,4 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ (média \pm DPM).

ΔT = Temperatura de animais tratados - Temperatura de animais controles.



forma significativa, em relação aos animais apenas tratados com MTX. Já os animais isogênicos infectados com Pb e tratados com MTX não apresentaram, após a reposição de CME de doadores normais, alterações significativas no número de leucócitos circulantes, quando comparado ao grupo infectado e tratado com o agente leucopênico (figura 9-B).

Quando se analisou o número de neutrófilos e linfócitos circulantes, após a reposição de CME de doadores normais, observou-se que nos animais tratados com MTX o número de neutrófilos aumentou do 3º ao 6º dia de acompanhamento ($p < 0,05$), enquanto que o número de linfócitos somente sofreu alteração no 7º dia (figura 10), com significativa redução destas células. Animais infectados e tratados com o agente leucopênico que receberam a reposição de CME, não apresentaram alterações significativas no número de neutrófilos e linfócitos circulantes em praticamente todos os dias analisados, exceto no 6º dia de infecção, onde os animais apresentaram um aumento, estatisticamente significativo ($p < 0,005$), no número de neutrófilos, em relação ao grupo infectado e tratado com MTX (figura 10).

A figura 11 mostra as alterações da relação de Staub de animais B 10A normais que receberam transferência de CME de animais isogênicos infectados (7º dia de infecção). Pode-se observar que a relação PP/PC aumentou, progressivamente, após a transferência de CME, atingindo, na 3ª hora, o pico máximo de alteração, com valores em torno de 25% acima dos controles. Em seguida, so

8803017/22
27/10/82

FIGURA 9 - Efeito da reposição de células mononucleares esplênicas (CME) sobre o número de leucócitos circulantes de camundongos B 10A tratados com MTX (9-A) e infectados com P.berghei e tratados com MTX (9-B), durante sete dias de acompanhamento.

- As barras verticais indicam \pm DP. Em alguns pontos foram colocados ou o desvio positivo ou o desvio negativo, apenas para facilitar a ilustração.

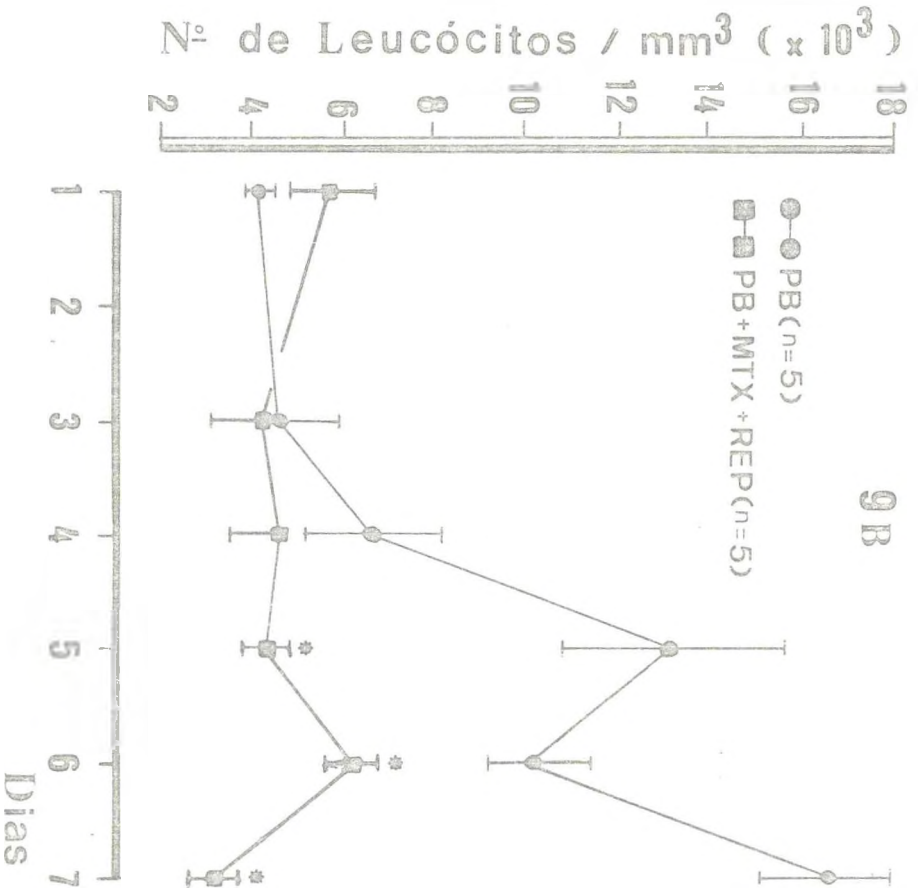
a - representa o número de animais utilizados em cada ponto experimental.

★ - diferença de médias, em relação ao grupo controle, estatisticamente significativa ($\star p < 0,01$).

* - diferença de médias, em relação ao grupo de animais apenas infectados com Pb, estatisticamente significativa ($* p < 0,001$).

- os animais receberam duas injeções de CME: no 1º e 5º dias.

9B



9A

Nº de Leucócitos / mm³ (x 10³)

▲-▲ MTX + REP (n=3)^a
■-■ MTX (n=3)

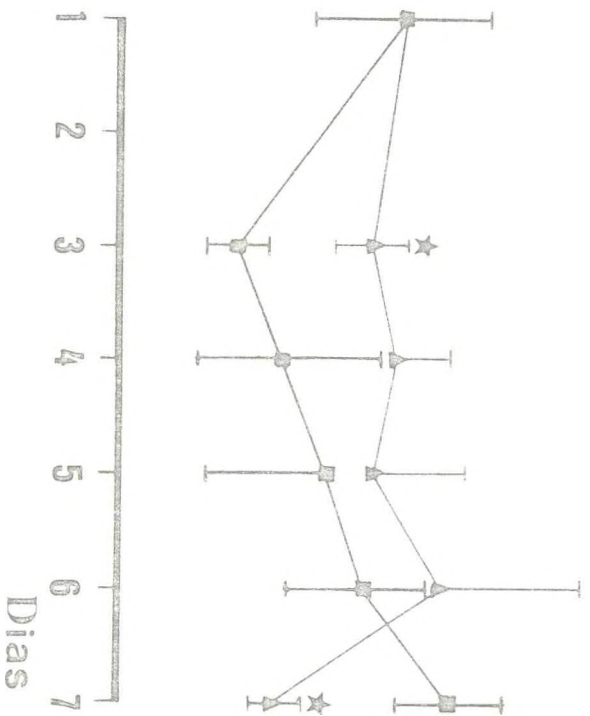


FIGURA 10 - Efeito da reposição de CME de doadores normais sobre o número de neutrófilos e linfócitos circulantes de camundongos B 10A tratados com MTX e infectados com P. berghei e tratados com MTX.

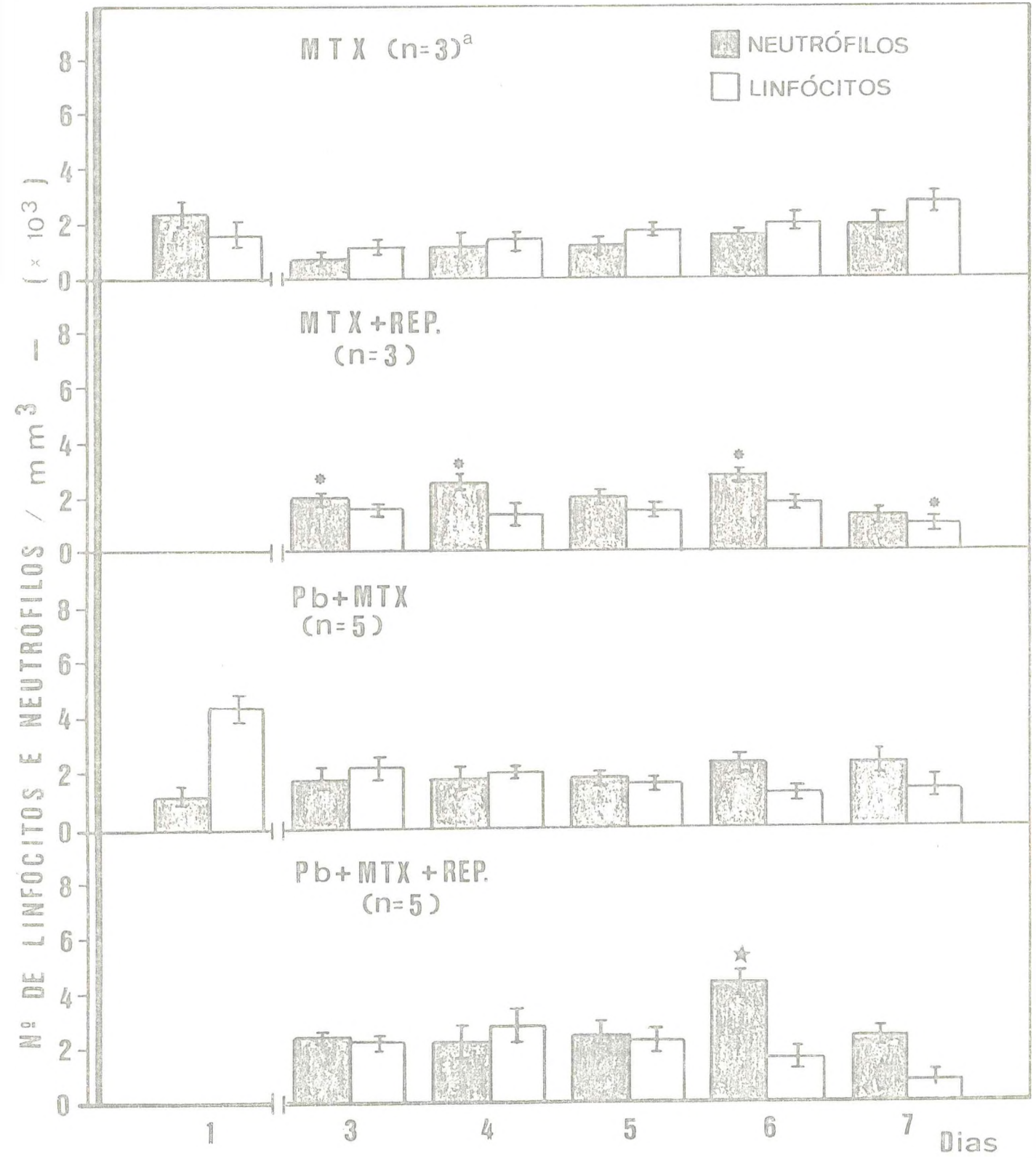
- As barras verticais indicam + DP.

a - representa o número de animais utilizados em cada ponto experimental.

* - diferença entre médias, em relação ao grupo tratado com MTX, estatisticamente significativa (* $p < 0,005$).

★ - diferença entre médias, em relação ao grupo infectado e tratado com MTX, estatisticamente significativa (★ $p < 0,005$).

- os animais receberam injeções de CME no 1º e 5º dias.



freu um decréscimo progressivo, embora ainda permanecesse, 24 horas após, significativamente elevada ($p < 0,05$).

As alterações no leucograma de camundongos normais que receberam a transferência de CME de animais infectados com Pb estão mostradas na figura 12. Observase, curiosamente, que na primeira hora após a transferência de CME os animais apresentaram uma redução no número de leucócitos circulantes. Na 2ª e 3ª hora o número de leucócitos retornou aos valores encontrados no tempo zero, voltando a diminuir, significativamente ($p < 0,05$), na 6ª e 24ª hora após a transferência de CME (figura 12-A). A contagem diferencial mostrou que neutrófilos e linfócitos sofreram uma queda nos seus números, na primeira hora após a transferência de CME. A partir de então, observou-se aumento progressivo dos neutrófilos circulantes, atingindo valores máximos 3 horas após a transferência. Posteriormente, o leucograma dos animais mostrou acentuada queda no número de neutrófilos, embora permanecessem como as células predominantes até a 6ª hora após a injeção de CME. Os linfócitos apresentaram comportamento diferente, com uma queda progressiva de seus números até a 6ª hora. Os valores de linfócitos circulantes obtidos na 24ª hora, ainda que superiores aos obtidos na 6ª hora após a transferência de CME, foram significativamente menores ($p < 0,05$) em relação ao número destas células no tempo zero (figura 12-B).

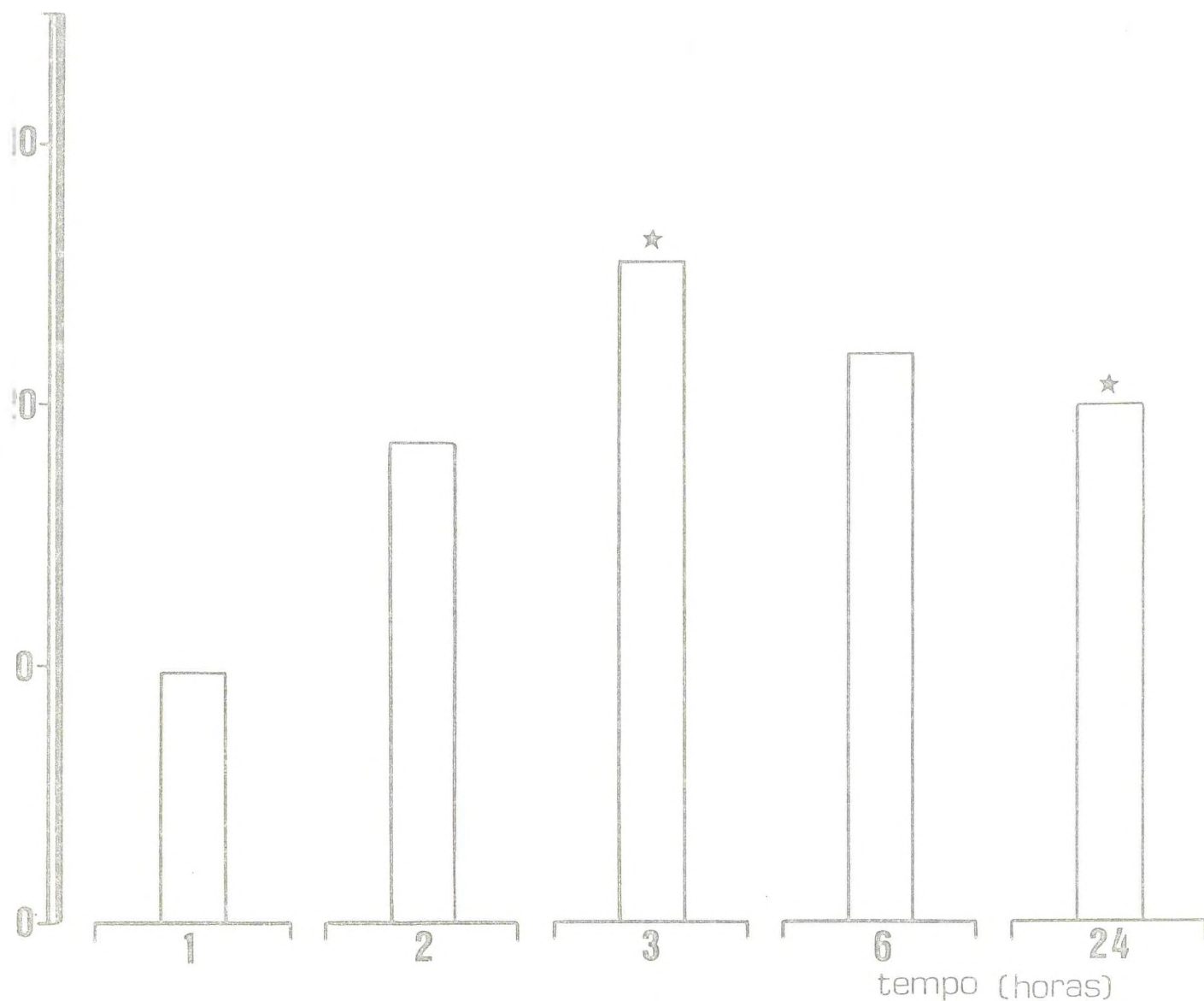


FIGURA 11 - Percentagem de aumento da relação PP/PC de animais B 10A normais após transferência de CME de doadores infectados (7º dia de infecção).

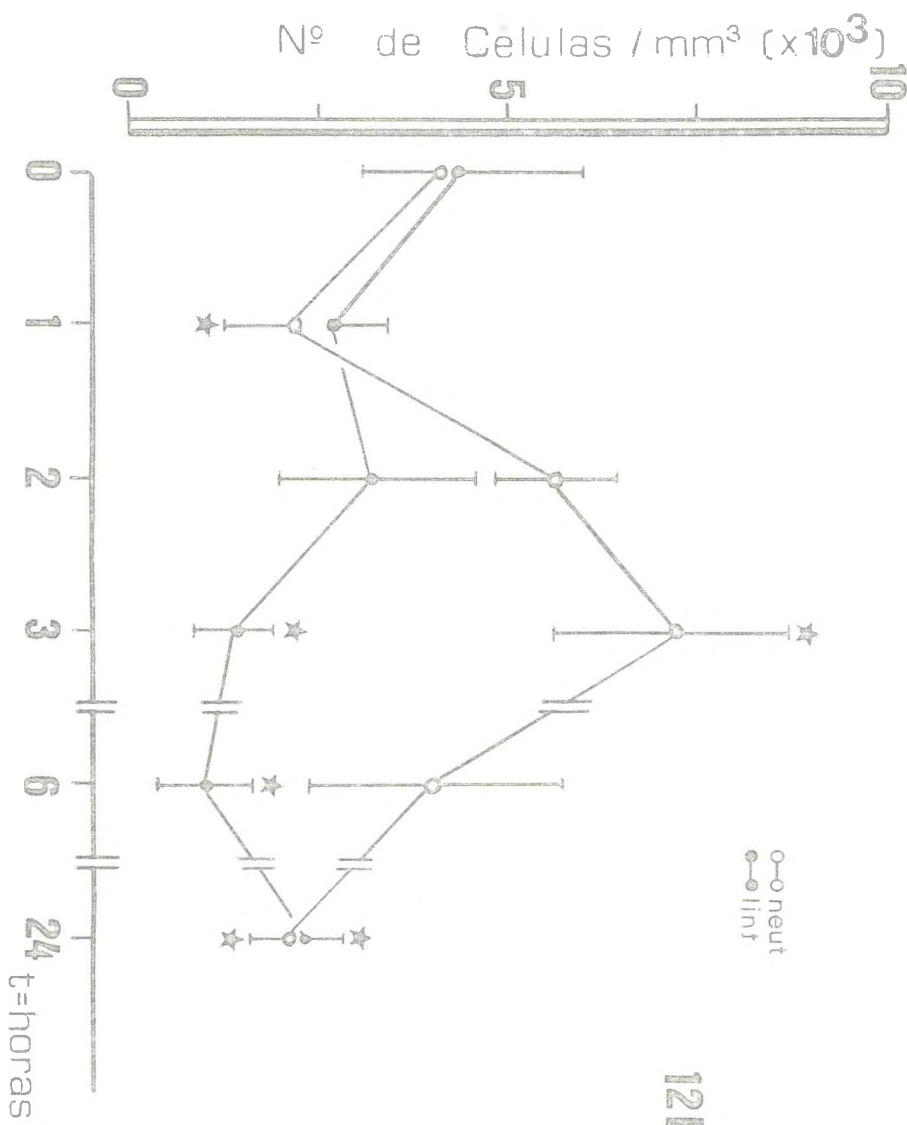
- O número de animais utilizados em cada tempo experimental foi n=5.
- ★- valor estatisticamente diferente, em relação aos controles (★ $p < 0,05$).
- valor da relação PP/PC de animais controles foi $0,0069 \pm 0,0003$ (média \pm DP; n=5).

FIGURA 12 -- Efeito da transferência de células mononucleares esplênicas de doadores infectados (7º dia de infecção) sobre o número de leucócitos totais (12-A) e sobre o número de neutrófilos e linfócitos circulantes (12-B) de animais B 10A normais.

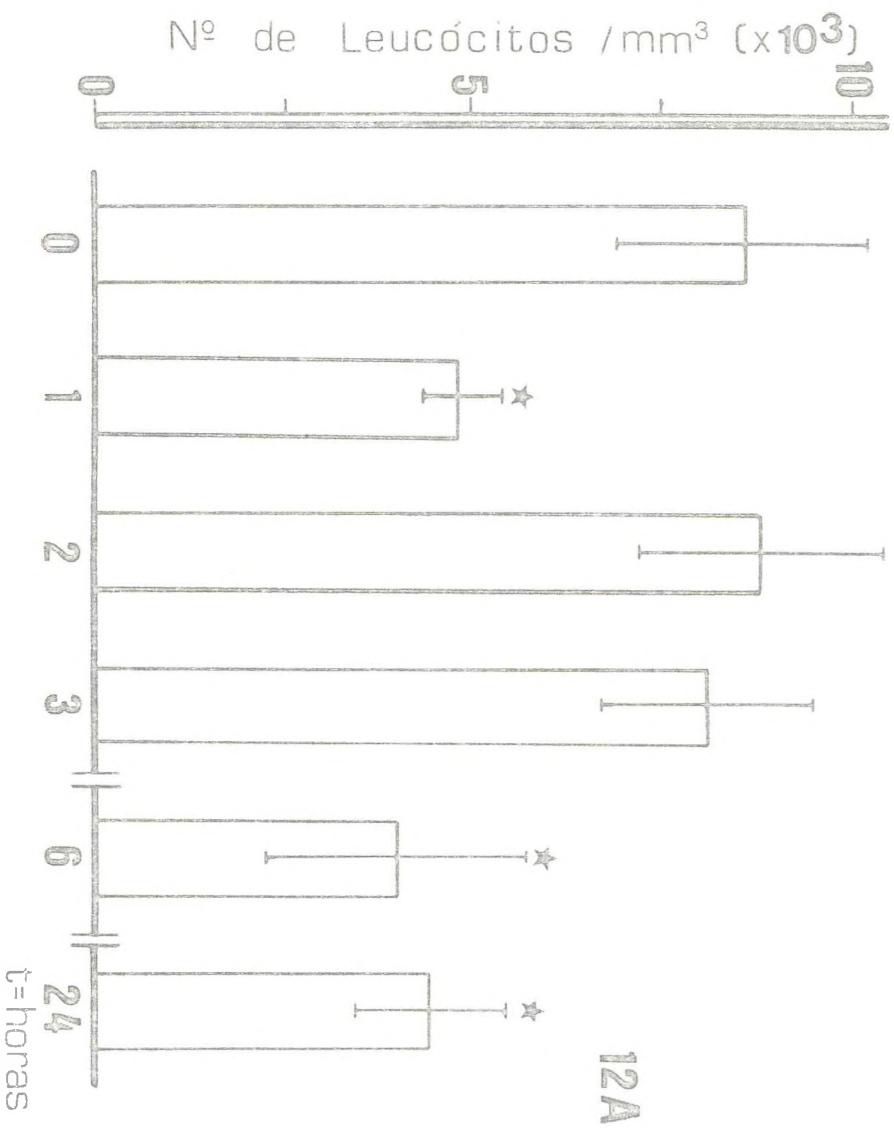
- as barras verticais representam \pm DP.

- o número de animais utilizados em cada tempo experimental foi n=5.

☆- valores estatisticamente significantes, em relação aos valores obtidos no tempo zero (☆ $p < 0,005$).



12B



DISCUSSÃO

A infecção de camundongos Swiss-44 ou B 10-A com P.berghei-cepa "Pasteur" causou um aumento progressivo do número de hemácias parasitadas (figura 1).

O MTX, um derivado das diaminopirimidinas, foi capaz de reduzir, parcialmente, a parasitemia de animais infectados, como pode ser observado na figura 1. Este efeito pode ser explicado, pelo menos em parte, baseando-se no fato do MTX ser capaz de inibir a atividade da diidrofolato redutase (DHR), enzima chave na síntese de folatos cuja existência tem sido demonstrada em várias espécies de plasmódios, inclusive no P.berghei, onde foi primeiramente isolada (Ferone, 1977). Entretanto, diferentemente da pirimetamina e do trimetoprim, derivados de molécula pequena das diaminopirimidinas, foi demonstrado que o MTX tem pouca atividade antimicrobiana, embora preparações da enzima (DHR) de origens bacterianas, protozoárias e mamíferas, sejam todas inibidas, "in vitro", por concentrações nanomolares da droga (Rollo, 1980). Este fato parece estar diretamente relacionado à capacidade das células transportarem folato ou seus análogos através de suas membranas. A maioria dos microorganismos que apresentam capacidade de síntese de folato, fundamentalmente a partir de PABA, GTP e glutamato (Sherman, 1979), são impermeáveis a esta substância e este parece ser o caso, dos protozoários do gênero Plasmodium (Ferone, 1977).

A piremetamina e o trimetoprim, entretanto, parecem penetrar nas células por difusão não-iônica e acredita-se que este processo seja independente da capacidade das células assimilarem folato (Hitchings e Burchall, 1965 apud Goodman e Gilman, 1980). A partir destes últimos relatos, o esperado seria que o MTX não penetrasse nas células do parasita. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem, contrariamente, que este antifólico deve estar sendo transportado, em parte, para dentro das células do parasita, já que houve redução da parasitemia dos animais infectados tratados com a droga. Estudos posteriores, tais como, a influência da suplementação da dieta dos animais com PABA, deverão ser conduzidos na tentativa de esclarecer estes achados. Resta ainda, considerar a possibilidade de um efeito inespecífico do MTX sobre o parasita ou deletério para os eritrócitos do hospedeiro, o que, conseqüentemente, impediria o desenvolvimento do plasmódio. Esta última possibilidade, entretanto, se mostra pouco viável, já que o MTX não alterou a imunocompetência das CME de doadores normais transferidos à camundongos B 10A infectados e tratados com este antifólico. Como pode ser observado, a reposição de CME nestes animais foi capaz de reduzir, ainda mais, a parasitemia, quando comparados aos níveis de hemácias parasitadas dos animais infectados e tratados com MTX (figura 1-B), sugerindo uma participação ativa das células repostas na destruição dos parasitas.

Embora a redução de parasitemia de camundongos infectados e tratados com o agente leucopênico seja um dado importante, não se pode explicar, apenas por este fato, o efeito marcadamente inibitório do tratamento com MTX sobre a instalação de várias alterações fisiopatológicas observadas em animais infectados com P.berghei (ver Resultados). Deve-se observar que os animais infectados e tratados com MTX apresentaram, no final da infecção, níveis de hemácias parasitadas superiores aos encontrados no 5º dia, em camundongos apenas infectados com P.berghei (figura 1). Com este nível de parasitemia (cerca de 30%) tanto camundongos Swiss-44 como B 10A não tratados com MTX apresentaram alterações bastante significativas da relação PP/PC, temperatura corporal e número de leucócitos circulantes (figuras 2, 3 e 4, respectivamente). Além destas observações, vários trabalhos têm demonstrado ausência de correlação direta entre o grau de severidade da infecção malárica (por exemplo, o índice de mortalidade) e os níveis de parasitemia.

Muller (1982) e Rodrigues e Silva (1982) demonstraram que camundongos Swiss-44 infectados com P.berghei com um inóculo de 10^5 hemácias parasitadas morreram no 8º dia de infecção com apenas 30% de parasitemia, enquanto que os animais que receberam um inóculo mil vezes maior morreram no 7º dia de infecção com uma parasitemia de 70%, tendo apresentado 30% de parasitemia, no 3º dia da doença. Estes trabalhos demonstra -

ram, claramente, que não houve qualquer proporcionalidade entre a taxa de parasitemia e o tempo de sobrevivência dos animais, embora exista uma correlação direta entre os níveis de parasitemia e o inóculo utilizado. Resultados semelhantes foram obtidos por Van Zon et al (1978) utilizando o P.berghei-cepa K 173 e seis linhagens diferentes de camundongos. Os autores demonstraram que a mortalidade e os níveis séricos de aspartato amino-transferase não apresentaram relação com os níveis de parasitemia dos animais infectados. Quando consideraram a parasitemia e as concentrações séricas da enzima utilizada como índice de injúria hepática observaram que estes parâmetros eram destituídos de qualquer valor prognóstico para o desenvolvimento da doença. Estes trabalhos demonstraram que a parasitemia não é, portanto, o único indicador do grau de severidade da doença. Os resultados presentemente obtidos, de certa forma, também confirmam esta hipótese. Observe-se, por exemplo, que enquanto a parasitemia de animais B 10A aproximadamente dobrou do 5º para o 7º dia (figura 1-B), a relação de Staub aumentou em apenas 30% (figura 2-D). Neste mesmo período não ocorreram praticamente, alterações da temperatura corporal (variação menor que 1°C) e, além disto, a maior queda da temperatura foi observada do 4º dia para o 5º dia, quando os animais apresentaram cerca de 30% de células parasitadas (figura 3-B). Deve-se ressaltar, entretanto, que níveis de células parasitadas expressos em termos de parasitemia

(isto é, percentagem de células parasitadas) não é o melhor parâmetro para se avaliar o grau de infecção dos animais (Maurois et al., 1978). Este parâmetro deveria sofrer alguma correção, considerando-se, por exemplo, ou o número de eritrócitos/mm³ de sangue ou o hematócrito dos animais, já que a malária provoca, sabidamente, severa anemia. Assim, levando-se em conta estas considerações é possível que um animal com 30% de hemácias parasitadas apresente um grau de infecção maior do que um com 55% de parasitemia. Bastaria, por exemplo, que o número de eritrócitos/mm³ fosse, respectivamente, 4×10^6 e $1,8 \times 10^6$, para que o primeiro animal apresentasse uma carga parasitária, aproximadamente, 1,2 vezes maior que a do segundo. Pelo exposto, é possível, então, que os níveis de parasitemia nos animais infectados e tratados com MTX, no final da doença, representem, na realidade, uma subestimação do grau de infecção destes animais, e que, em sentido oposto, a parasitemia de animais infectados com o P. berghei, neste mesmo período, represente uma superestimativa.

Os níveis de proteína totais de camundongos Swiss-44 não se alteraram de forma estatisticamente significativa, durante os sete dias de infecção malárica (tabela 1). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Cunha (1981), Muller (1982) e Rodrigues e Silva (1982). Embora os níveis plasmáticos de proteínas totais não se alterem na malária murina, poderia

se admitir que variações qualitativas possam estar ocorrendo. Tal hipótese foi também sugerida por Cunha (1981). Trabalhos realizados por Sadun et al. (1965), em camundongos, e Tella e Maegraith (1965), em macacos e camundongos, apontam evidências neste sentido. Estes autores demonstraram um aumento dos níveis de gama-globulinas e queda dos níveis plasmáticos de albumina. A queda nas concentrações de albumina foi considerada como sendo consequência do comprometimento hepático observado nestes animais. Estes resultados, entretanto, não foram confirmados por Sengers (1971). Este autor, utilizando técnicas de eletroforese em acetato de celulose, imunoeletroforese e dosagem colorimétrica, demonstrou que não houve alteração, nem dos níveis de proteínas totais, nem da relação albumina/globulina de camundongos infectados com P.berghei, durante os 6 dias analisados. Resultados semelhantes, utilizando o mesmo modelo de malária experimental, foram obtidos por Cordeiro et al. (1983).

Apesar do MTX, assim como outras drogas anti-tumorais, causar severa hepatotoxicidade (Zubrod, 1974), camundongos Swiss-44 infectados ou não com P.berghei e tratados com este anti-fólico não apresentaram alterações significativas nos níveis plasmáticos de proteínas totais (tabela 1). Entretanto, a concentração de proteínas totais tem pouco valor para a determinação de insuficiência hepática, já que as concentrações de albumina e globulinas séricas são muito variáveis. "A

soma dessas duas frações oscila entre amplos limites na presença de doença hepática" (Vieira et al., 1979). Os níveis de albumina plasmática e/ou de transaminases (glutâmico-oxalacética e glutâmico-pirúvica), ou ainda, evidências diretas de alterações histopatológicas, seriam melhores indicadores. Este ponto permanece por ser estudado.

Neste trabalho utilizou-se o aumento da relação PP/PC como um reflexo da formação de edema pulmonar. Como pode ser observado, tanto animais Swiss-44 como B 10A apresentaram desenvolvimento de intenso edema pulmonar com o decorrer da infecção (figuras 2 B e D). Estas observações estão de acordo com os achados de Cordeiro et al. (1976), Cunha (1981) e Muller (1982).

Cunha (1981) e Muller (1982) demonstraram que havia uma correlação direta entre o aumento da relação PP/PC e o aparecimento de alterações histopatológicas nos pulmões de animais infectados, e que esta técnica apresentou um bom grau de confiabilidade e reprodutibilidade. Weiss (1978) também demonstrou desenvolvimento de edema pulmonar em camundongos infectados com P. berghei, e a observação histológica dos pulmões revelou intenso edema alveolar e a presença, detectada por técnicas de imunofluorescência, de complexos imunes.

Na espécie humana também tem sido descrita a ocorrência de severo edema pulmonar, especialmente nos casos de malária causada pelo P.falciparum, e um dos relatos mais antigos foi fornecido por Watson (1905).

A fisiopatologia desta complicação, na malária, ainda permanece desconhecida (Punyagupta et al., 1974). Há relatos na literatura de que a queda da pressão oncótica, principalmente devido à diminuição dos níveis séricos de albumina, seria o fundamento necessário para se explicar adequadamente a formação do edema pulmonar (Hall, 1977). Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho, e também por outros autores (Cunha, 1981; Muller, 1982), sugerem que a pressão oncótica do plasma não deve estar variando, já que não houve alterações nos níveis de proteínas totais (tabela 1). Além disto, tem sido demonstrado que a razão albumina/globulina também não se altera em camundongos infectados com P.berghei (Sengers, 1971; Cordeiro et al. 1983). Desta forma, outros argumentos devem ser levantados para se tentar explicar a instalação do edema pulmonar na malária murina.

Brooks et al (1967 e 1968) apresentaram evidências de que uma severa disfunção da microcirculação pulmonar e aumento da permeabilidade vascular possam ser os fatores determinantes no desenvolvimento de edema pulmonar na malária humana.

Cordeiro et al. (1976) e Cunha (1981) observaram que várias das alterações patológicas que ocorrem em camundongos infectados com P.berghei poderiam ser iniciadas e/ou moduladas por mediadores clássicos de uma reação inflamatória.

Estes relatos estão de acordo com a visão de que, na malária, a maioria dos eventos fisiopatológicos são de natureza inflamatória (Maegraith e Fletcher, 1972). Um dos primeiros relatos de que os fenômenos circulatórios que ocorrem nesta patologia se assemelham a um quadro inflamatório agudo foi fornecido por Cannon (1941).

A participação de cininas na malária tem sido demonstrada (Goodwin e Richards, 1960; Onabanjo e Maegraith, 1970b/1971; Ohtomo e Katori, 1972; Cunha, 1981; Cordeiro et al., 1983), assim como a ativação do sistema nervoso simpático (Skirrow et al., 1965; Sharma et al., 1979).

O envolvimento da bradicinina, uma das mais importantes cininas, descoberta por Rocha e Silva et al., (1949), e suas interações com outros mediadores e/ou sistemas em várias condições fisiopatológicas são bastante difundidas (Cordeiro, 1978; Garcia Leme, 1978).

Hilton e Lewis (1956), e mais recentemente Gautvik et al. (1974), demonstraram o aparecimento de uma enzima formadora de cininas na glândula submaxilar do gato, após estimulação simpática. Vugman (1963) mostrou que a administração endovenosa de l-adrenalina depletava os níveis de cininógeno plasmático e provocava intenso edema pulmonar em cobaias. O mesmo efeito foi demonstrado em ratos por Castania e Rothschild (1974). Estes autores demonstraram, também, que a incubação do sangue com adrenalina "in vitro" elevava a

atividade fibrinolítica do plasma destes animais. Posteriormente, Rothschild et al. (1974a,b) demonstraram que a ação cininogenopênica da adrenalina, em ratos, dependia da participação de leucócitos e ocorria, basicamente, pela ativação de receptores alfa-adrenérgicos. Foi demonstrado, também, em camundongos, a formação de edema pulmonar após a administração endovenosa de adrenalina (Cassen e Kistler, 1954).

Com base nestes dados é bastante sugestiva a especulação de que o edema pulmonar apresentado pelos animais infectados com P.berghei seja mediado, pelo menos em parte, pelo sistema cininógeno-cinina e que a ativação deste sistema se faça, intermediariamente, através de catecolaminas e células brancas. Esta é uma possibilidade provável, já que Cunha (1981) e Flores et al. (1983) demonstraram que o edema pulmonar se apresentava parcialmente inibido em animais infectados com P.berghei tratados com o alfa-simpatolítico, fenoxibenzamina. Entretanto, esta não parece ser a única via possível para a ativação do sistema formador de cininas. Outros eventos que possivelmente ocorrem na malária, tais como, ativação do sistema de complemento (Neva et al., 1970; Weiss, 1978), anóxia tecidual e coagulação intravascular disseminada, como em casos graves de malária humana (Hall, 1977), podem contribuir, sinergicamente, para a formação de cininas. Além disto, este não é, provavelmente, o único mediador envolvido na gênese e manutenção desta alteração fisiopato-

lógica. Cunha (1981) demonstrou que, além de cininas, serotonina e prostaglandinas parecem, também, participar deste processo, já que o tratamento dos animais infectados com PCPA (inibidor da síntese de serotonina), metisergida (inibidor do receptor de serotonina) ou indometacina (inibidor da síntese de prostaglandina) foi capaz de inibir, parcialmente, o desenvolvimento de edema pulmonar.

Poderia se questionar se o envolvimento de catecolaminas na formação de edema pulmonar em animais infectados não ocorreria através de uma ação direta destes mediadores sobre vasos, promovendo alterações hemodinâmicas suficientes para provocar um aumento de pressão hidrostática e extravasamento de líquido. Visscher et al. (1956) consideraram que o aumento da pressão venosa pulmonar e o efeito congestivo capilar da adrenalina em altas doses, poderiam explicar adequadamente o fenômeno. Esta hipótese, entretanto, não é compartilhada por vários autores que sugerem a liberação e participação de mediadores vasodilatadores e permeabilizantes como peças fundamentais para a instalação desta alteração fisiopatológica (Bohm, 1966; Shigei et al. 1967; Oliveira Antônio, 1973). Além disto, acredita-se que, especificamente na malária, este não seja o caso, já que Ohtomo e Katori (1972) demonstraram que a pressão arterial de camundongos infectados com P.berghei caiu do nível de 80,2 para 51,4 mmHg na fase final da infecção, a despeito das evidências, anteriormente citadas, de hiperatividade simpática.

Existem relatos de que tanto na malária murina (Yoeli, 1976), como na malária humana (WHO, 1975; Hall, 1977) pode ocorrer comprometimento do sistema nervoso central. Punyagupta et al. (1974) correlacionaram o desenvolvimento de edema pulmonar em casos severos de malária por P.falciparum, com comprometimento cerebral. Atualmente em nosso laboratório estamos realizando trabalhos no sentido de verificar o envolvimento ou não do sistema nervoso central na formação de edema pulmonar, já que estudos em andamento mostraram a ocorrência de edema cerebral intenso na fase final da doença, em camundongos Swiss-44 infectados com P.berghei.

Uma das demonstrações clínicas mais evidentes na malária humana é o aparecimento de surtos periódicos de febre. Entretanto, camundongos infectados com P.berghei apresentaram profunda hipotermia com o decorrer da infecção (figura 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Cunha (1981), Rodrigues e Silva (1982) e Cordeiro et al. (1983).

A presença de paroxismos está intimamente relacionada ao processo de rompimento das hemácias (Pessoa, 1974). No hospedeiro vertebrado o P.berghei apresenta um ciclo assincrônico (WHO, 1975) e, portanto, a ausência de surtos em camundongos infectados com este parasita pode ser consequência da presença simultânea, no sangue, de várias de suas formas evolutivas.

De acordo com Rodrigues e Silva (1982) uma hipótese que poderia justificar a hipotermia em camundongos seria a presença de um mecanismo termorregulador diferente da espécie humana, além da alta condutância térmica destes animais.

A participação de fatores humorais, tais como aminas biogênicas, no controle da temperatura corporal tem sido sugerida (Hellon, 1975). Brittain e Handley (1967) e Shaw (1971) demonstraram que a administração de histamina, serotonina ou catecolaminas nos ventrículos cerebrais de camundongos normais provocou hipotermia. Entretanto, Cunha (1981) observou que camundongos infectados com P.berghei tratados com fenoxibenzamina apresentaram potenciação da hipotermia. Este autor sugeriu que, na malária, as catecolaminas estariam, possivelmente, atuando como agentes hipertérmicos.

As prostaglandinas são, reconhecidamente, poderosos agentes hipertérmicos (Feldeberg e Milton, 1978; Milton e Wendlandt, 1971). Clark e Clark (1980) relataram que enquanto as prostaglandinas da série E, PGE_1 e PGE_2 , injetadas nos ventrículos cerebrais de camundongos causaram febre, a injeção de $PGF_{2\alpha}$ produziu queda da temperatura corporal. Foi demonstrado que embora as concentrações de $PGF_{2\alpha}$ sejam apreciáveis no cérebro como um todo (Gilmore, 1968), ao contrário das prostaglandinas da série E, esta prostaglandina parece não estar envolvida com os mecanismos de alteração de temperatura (Hellon, 1975; Milton, 1976).

Cunha (1981) demonstrou aumento significativo dos níveis de prostaglandinas no sistema nervoso central de camundongos infectados com P.berghei, embora os animais se mostrassem profundamente hipotérmicos. Entretanto, o tratamento dos animais com indometacina, um potente inibidor da síntese de prostaglandinas, potencializou a hipotermia destes animais. Com base nestes resultados o autor sugeriu que, embora os níveis de prostaglandinas estivessem aumentados em animais infectados, o que poderia desencadear a produção da febre, os mecanismos de perda de calor deveriam prevalecer, já que o resultado final era uma intensa hipotermia.

Não estão descartadas as possíveis participações de outros mediadores, tais como serotonina, histamina, dopamina e endorfinas, na hipotermia observada em camundongos maláricos. Este ponto permanece em aberto para futuras investigações.

A participação de células brancas em reações inflamatórias é um fenômeno bastante conhecido, já que "uma das características histológicas básicas do processo inflamatório é a infiltração do tecido afetado pelos leucócitos" (Sudo, 1979).

Contrariamente ao que geralmente ocorre na infecção malárica humana, camundongos infectados com P.berghei desenvolveram intensa e progressiva leucocitose, com neutrofilia e linfocitose, com o decorrer da doença (figuras 4-B e 4-D, 5 e 6).

Um dos fatos que mais despertou atenção neste trabalho foi a estrita relação mantida entre o aparecimento de alterações fisiopatológicas e o desenvolvimento de leucocitose. Curiosamente, quando os animais, Swiss-44 ou B10A, começaram a apresentar aumento do número de leucócitos (figuras 4-B e 4-D), paralelamente começaram a ocorrer alterações significativas na relação de Staub (figuras 2-B e 2-D) e temperatura corporal (figura 3). Estas observações foram bastante sugestivas de que células da linhagem leucocitária poderiam estar participando, direta e/ou indiretamente, na formação e/ou modulação destas alterações.

Corroborando estas evidências está um achado bastante interessante descrito por Topley et al. (1970). Estes autores, utilizando o P.berghei yoelii-cepa 17X e camundongos Balb/C, demonstraram leucocitose com o decorrer da infecção. Como neste modelo a infecção não foi letal, o número de leucócitos aumentou progressivamente até um máximo e retornou aos níveis normais, quando os animais não apresentaram mais os sintomas da doença e a parasitemia era imperceptível.

O tratamento de animais Swiss-44 ou B10A normais com MTX foi efetivo em causar leucopenia (figura 4 A/C), mas não alterou a relação de Staub (figuras 2--A/C) ou a temperatura corporal (figura 3), quando comparados aos animais controles.

Na relação de Staub um dos fatores que afetam diretamente este parâmetro é o peso corporal. En-

tretanto, não foram detectadas alterações de peso corporal em animais tratados com MTX, em ambas as espécies estudadas (resultados não apresentados). Ratos pré-tratados com este mesmo agente antifólico também não apresentaram alterações de peso durante o tratamento, como foi demonstrado por Leme et al. (1976).

Vale registrar que existe pelo menos um dado na literatura descrevendo severa doença pulmonar, caracterizada por febre, tosse, dispnea, cianose e edema dos pulmões, em pacientes leucêmicos submetidos ao tratamento com MTX (Clarysse et al., 1969). O estudo histopatológico dos pulmões de um dos pacientes revelou que este órgão apresentava lesões granulomatosas intra-alveolar e intersticial. Nenhuma associação da doença pulmonar com a presença concomitante de infecção causada por bactérias, fungos ou vírus pode ser demonstrada. Desta forma, os autores descreveram que esta anomalia deveria estar relacionada, provavelmente, com o tratamento com o MTX, já que 38 dos 98 pacientes, submetidos a terapia com a droga, apresentaram esta complicação. Apesar disto, como foi descrito anteriormente, camundongos tratados com MTX não apresentaram indícios de acometimento pulmonar, com base no fato de que a relação PP/PC não se alterou em relação aos controles, durante o tratamento. Embora não se possa afirmar categoricamente que não houve alteração a nível pulmonar, acredita-se, contudo, que seja muito pouco provável a ocorrência de tais alterações, já que o trabalho des —

crito por Clarysse et al. (1969) descreve alterações bastante severas dos pulmões, o que seria detectado pelo método utilizado. Entretanto, como estes estudos foram realizados na espécie humana, análises histopatológicas, no camundongo, deverão ser realizadas para uma argumentação mais definitiva.

O presente trabalho demonstrou que o tratamento de animais infectados com P.berghei com MTX inibiu, de forma bastante acentuada, o desenvolvimento de edema pulmonar e hipotermia. Estes resultados reforçaram ainda mais a hipótese de que células da linhagem leucocitária poderiam estar participando da instalação destes fenômenos. Além disto, Cunha (1981) demonstrou que os pulmões de camundongos infectados (7º dia de infecção) apresentaram um intenso infiltrado celular peribronquiolar, fornecendo, desta forma, uma evidência direta destes elementos figurados no local da alteração.

Tem sido demonstrado que após a interação de leucócitos ou de várias células do sistema fagócito mononuclear com diversos agentes capazes de promoverem alterações na temperatura corporal, tais como, bactérias, vírus, fungos, protozoários, etc. (coletivamente chamados pirógenos exógenos) há liberação de mediadores conhecidos como pirógenos endógenos, os quais, a nível hipotalâmico, liberam prostaglandinas da série E (Bornstein e Woods, 1969; Hellon, 1975; Milton, 1976; Feldberg e Milton, 1978).