

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

**Bárbara Albuquerque Carpinter**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO OMEGA-3 RICO EM  
DHA CONTRA O DESENVOLVIMENTO DE MALÁRIA CEREBRAL EM  
MODELO MURINO**

Tese

Juiz de Fora

2023

**BÁRBARA ALBUQUERQUE CARPINTER**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO OMEGA-3 RICO EM  
DHA CONTRA O DESENVOLVIMENTO DE MALARIA CEREBRAL EM  
MODELO MURINO**

Tese de Doutorado do Curso de  
Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Área:  
Imunologia e Doenças Infecto-  
Parasitárias, para obtenção do Título  
de Doutor (a) em Ciências Biológicas  
na área de Imunologia e Doenças-  
infecto-parasitárias.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kézia K. G. Scopel**

Juiz de Fora

2023

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

Albuquerque Carpinter, Bárbara .

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO OMEGA-3 RICO EM DHA CONTRA O DESENVOLVIMENTO DE MALÁRIA CEREBRAL EM MODELO MURINO / Bárbara

Albuquerque Carpinter. -- 2023.

137 p. : il.

Orientadora: Kezia Katiani Gorza Scopel

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. malária. 2. malária cerebral. 3. malária experimental. 4. ômega-3. 5. DHA. I. Katiani Gorza Scopel, Kezia, orient. II. Título.

**Bárbara Albuquerque Carpinter**

**AValiação da Atividade Anti-Inflamatória do Omega-3 Rico em DHA Contra o Desenvolvimento de Malaria Cerebral em Modelo Murino,**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia & Doenças Infectoparasitárias

Aprovada em 30 de março de 2023

**BANCA EXAMINADORA**

**Profª. Drª. Kezia Katiani Gorza Scopel** - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

**Profª. Drª. Clarice Abramo**

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

**Prof. Dr. Eugênio Damaceno Hottz**

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

**Prof. Dr. Leonardo José de Moura Carvalho**

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

**Profª. Drª. Tatiani Uceli Maioli**

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Juiz de Fora, 21/03/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Kezia Katiani Gorza Scopel, Professor(a)**, em 30/03/2023, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clarice Abramo, Professor(a)**, em 30/03/2023, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LEONARDO JOSÉ DE MOURA CARVALHO, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiani Uceli Maioli, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Barbara Albuquerque Carpinter, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eugenio Damaceno Hottz, Professor(a)**, em 01/04/2023, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1195078** e o código CRC **B1C4B3FB**.

Dedico este trabalho aos meus pais, obrigada por investirem incessantemente nos meus estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois sem ele, eu não teria forças para ter concluído esta etapa e discernimento para tomar todas as decisões que foram necessárias. Sempre nos abençoando, esteve à frente de todos os processos.

Em seguida, agradeço à vida dos camundongos utilizados durante este estudo. Sou extremamente grata a vida destes animais, que, apesar da tecnologia atual, ainda são necessários e muito importante para o desenvolvimento da ciência e da nossa sociedade.

Agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Instituto de Ciências Biológicas, minha casa durante onze anos, agradeço pela oportunidade que me forneceu para eu aprender, viver e por fornecer toda estrutura necessária para meus estudos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pelo suporte financeiro, estrutural, e por ter possibilitado a minha formação enquanto pesquisadora.

Agradeço às agências de fomento, CAPES, CNPQ, FAPEMIG, que apesar de todos os cortes financeiros que ocorreram nos últimos anos, sempre honraram com seus compromissos, possibilitando o desenvolvimento desta pesquisa.

A banca avaliadora por aceitar avaliar e trazer melhoras significativas para este trabalho.

Agradeço aos professores Dr. Bruno Mietto, Dr. Eugenio Hotz, Dra. Flávia L. Ribeiro Gomes, Dr. Vinícius Rocha por todo apoio que forneceram no desenvolvimento deste trabalho, se mostraram muito dispostos e animados para embarcar nesse projeto e a testar as hipóteses necessárias.

Ao Núcleo de Pesquisa em Parasitologia por todos os anos de convivência e por todas as portas que abriram para mim durante este tempo. As professoras, técnicos e todos os alunos que passaram e me ajudaram durante esta jornada. Foram meus companheiros diários na conquista de um sonho. Levo muitos de vocês em meu coração, muito obrigada!

À minha orientadora, Dra. Kézia, não existe um modo de eu agradecer por tudo o que você trouxe para a minha formação. Desde a iniciação científica nos identificamos e fui recebida da melhor forma por você. Foram anos excepcionais. A você sou grata por toda dedicação para que nossos trabalhos tivessem sucesso, por todo gasto que teve para financiar este estudo, por todo carinho e afeto com que me acolheu. Obrigada!

A Dra. Daniela Renhe, começamos juntas no mundo acadêmico e a minha jornada definitivamente não teria sido a mesma sem você. Obrigada por todos os dias, todos os experimentos, toda a amizade e lealdade que nós temos!

Agradeço aos amigos de departamento, Dra. Ana Gualberto, Dr. Erick Esteves, Dra. Sara Malaguti, Dr. Rogério Lauria, Dra. Jacy Gameiro por toda ajuda em momentos de aperto.

A Camila Oliveira e a Natalia Fernandes, profissionais maravilhosas que me deram as mãos para concluir essa caminhada.

Aos meus amigos, minha segunda família, sorte a minha de ter tantos a nomear, uma rede de apoio maravilhosa em que eu pude contar durante todos esses anos e em momentos em que achava que não conseguiria terminar este trabalho. Vocês são muitos, são únicos e foram essenciais para que eu concluísse esta jornada!

Agradeço a minha família. Meus pais, Eliana e Carlos Henrique, minha irmã Mariana, meus tios e tias. Vocês sempre estiveram me apoiando em todos os momentos necessários e são os maiores incentivadores para eu conseguir alcançar minhas conquistas. Agradeço aos meus afilhados, Guilherme, Thomás, Luiza e Pedro, crianças que foram essenciais para ter forças para terminar este estudo, luzes da minha vida.

Por último, gostaria de agradecer a mim, por não ter desistido do sonho de ser pesquisadora e contribuir para a ciência.

Os cientistas dizem que somos feitos de átomos, mas um passarinho me diz que  
somos feitos de histórias.

Eduardo Galeano

## RESUMO

Há décadas esforços têm sido centrados para a eliminação da malária em todo o mundo. Apesar disso, esta ainda é uma doença que ameaça diversas populações em regiões tropicais e subtropicais, levando anualmente ao óbito milhares de crianças com menos de 5 anos. Uma vez não seja tratada adequadamente, o agravamento da malária pode levar ao desenvolvimento de síndromes como a malária cerebral (MC), principal responsável pelas mortes e causadora de diversas sequelas, especialmente a nível cognitivo nos pacientes que sobrevivem. Desse modo, faz-se necessário o uso de terapias que visem diminuir o índice de mortalidade/morbidade ocasionado pela MC. Atualmente, ainda não existem terapias adjuvantes específicas e recomendadas para auxiliar no tratamento da MC, mas vários estudos vêm mostrando que compostos com atividade anti-inflamatória pode amenizar os danos. Moléculas de ômega-3 têm propriedades anti-inflamatórias e são fundamentais na formação do sistema nervoso, auxiliando na proteção de células do tecido nervoso. Sabendo das suas propriedades anti-inflamatórias e da necessidade de uma terapia adjuvante que possa evitar o desenvolvimento ou auxiliar no tratamento da MC, neste estudo tivemos o objetivo de avaliar o efeito do ômega-3 (rico em DHA) na proteção contra o desenvolvimento de MC em modelo murino. Para tal, camundongos C57BL/6 foram tratados previamente com 1,5, 3,0 e 6,0 g/kg de DHA, e, após 15 dias, foi realizada a infecção com *P. berghei* ANKA. Foi possível observar que os animais tratados tiveram maiores porcentagens de sobrevivência de acordo com o aumento da dose utilizada. Entretanto, não houve efeito do tratamento sobre a parasitemia sanguínea dos mesmos. Do mesmo modo, de forma dose-dependente, houve uma diminuição nos danos causados na barreira hematoencefálica dos animais tratados com as maiores doses de ômega-3. Além disso, níveis de IL-10 e NO foram elevados nos animais sobreviventes a MC, e não foram observados nestes animais danos histopatológicos no cérebro. Assim, observamos que o DHA contido no óleo de peixe apresenta um efeito promissor contra o desenvolvimento de MC quando usado profilaticamente.

Palavras-chave: malária cerebral, ômega-3, DHA, tratamento adjuvante

## ABSTRACT

For decades, efforts have been focused on malaria elimination worldwide. Regardless, it is still a threatening disease for tropical and subtropical populations, causing thousands of child deaths every year. Once not properly treated, the severity of disease leads to the development of severe syndromes, such as cerebral malaria (CM), the main cause of death and cognitive sequelae in survival patients. In this sense, it is necessary the use of therapies that help to diminish the mortality/morbidity rates related to CM. Nowadays, there are still no adjuvant treatment specifics recommended to help with CM treatment, some studies are using anti-inflammatory molecules to alleviate the neurological damage caused by CM. Omega-3 molecules have anti-inflammatory properties and are fundamental to neuronal system formation and for the protection of the nervous tissue cells. Considering its anti-inflammatory properties and the need for adjuvant therapy for MC treatment or prophylactic use, in this study, we aimed to evaluate the DHA-rich omega-3 effects (DHA rich omega-3) at the protection against the development of CM in a murine model. C57BL/6 mice were treated with 1,5, 3,0, and 6,0 g/kg of DHA, and after 15 days, were infected with *P. berghei* ANKA. The results showed that treated animals had higher percentages of survival following increasing dosages, but there was no effect of the treatment on the blood parasitaemia. Thus, we observe that DHA contained in fish oil has a promising effect on the development of CM when used prophylactically.

Keywords: cerebral malaria, omega-3, DHA, adjuvant treatment

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Incidência mundial da malária em 2021. Adaptado de WHO, 2022. ....21
- Figura 2: Distribuição da malária no Brasil em 2021. Fonte: Ministério da Saúde, 2023. Acesso em 08/03/2023.....22
- Figura 3: Ciclo biológico das espécies de *Plasmodium* infectantes para o homem. Adaptado de Jensen et al., 2018. As formas esporozoítas do parasito são inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado e dão início ao ciclo hepático, onde há o desenvolvimento de merozoítos liberados na corrente sanguínea e estes são capazes de invadir hemácias, células nas quais há a realização do chamado ciclo sanguíneo, onde há o desenvolvimento de trofozoítos jovens, maduros e a formação de esquizontes, os quais geram novos merozoítos ou então levam a diferenciação das formas gametocíticas dos parasitos. Os gametócitos, quando ingeridos pelo mosquito vetor, realizam o ciclo sexuado do parasito, gerando esporozoítos que darão continuidade ao ciclo de vida em outro hospedeiro vertebrado.....26
- Figura 4: Representação gráfica da proporção de pacientes que apresentam os sintomas clássicos da malária. Adaptado de WHO Severe Malaria, 2014. ....30
- Figura 5. Esquematização da via metabólica de lipídeos da família ômega-3. O processo de derivação de lipídeos é realizado com a participação de diversas enzimas e dá origem a ácidos graxos importantes para os organismos. (Adaptado de SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018) .....41
- Figura 6: **Fluxograma grupos experimentais**. Os animais foram divididos em 5 grupos - **Controle**: animais sem infecção com PbA e sem tratamento; **PbA**: animais somente infectados com PbA e sem tratamento (n=6); **Tratados: 1,5 g/kg PbA**: animais que receberam 1,5 g/kg de DHA no óleo de peixe durante 15 dias e foram infectados por PbA (n=10); **3,0 g/kg PbA**: animais que receberam 3,0 g/kg de DHA no óleo de peixe durante 15 dias e foram infectados por PbA (n=17); **6,0 g/kg PbA**: animais que receberam 6,0 g/kg de DHA no óleo de peixe durante 15 dias e foram infectados por PbA (n=11).....49

Figura 7: Delineamentos experimentais: em ambos os desenhos experimentais os animais foram tratados durante 15 dias com ômega-3, por via oral, e então infectados por  $10^5$  hemácias parasitadas por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). **(A)** Após 4 dias da infecção, os animais foram acompanhados diariamente para quantificação da parasitemia sanguínea, realização da avaliação clínica dos animais e acompanhamento da sobrevivência dos mesmos. O tratamento com ômega-3 foi contínuo, mesmo após a infecção por PbA, até o 20 dpi. **(B)** Os animais foram eutanasiados para coleta de dados em dois momentos diferentes: no 7 dpi e 20 dpi.....50

Figura 8: Configurações utilizadas durante a leitura das microesferas no ensaio de CBA para detecção de citocinas em homogenato de cérebro. Em **A** podemos observar a localização das microesferas de acordo com o seu tamanho e granulosidade enquanto o gráfico **B** demonstra os picos que representam a presença de cada citocina na amostra, de acordo com sua fluorescência.....58

Figura 9: Estratégia de análise para observação das células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ . A estratégia utilizada para a análise da população celular presente no baço dos animais. Primeiramente foram selecionados os esplenócitos, em seguida, as células vivas de acordo com a marcação Live/Dead. Dentro desta população, as células expressando  $TCR^+$  foram selecionadas para ser observada a população de células  $CD4^+$  e  $CD8^+$ . .....60

Figura 10: Estratégia utilizada para delimitação das populações de neutrófilos e macrófagos presentes no baço. As células foram marcadas com Live/Dead, uma vez selecionadas, as células vivas, foi possível separar as que expressam marcador  $CD11b^+$  e avaliar o número de neutrófilos e monócitos inflamatórios nas amostras ( $CD11b^+ Ly6C^+ Ly6G^+$  e  $CD11b^+ Ly6C^{hi} Ly6G^-$  respectivamente).....61

Figura 11: Avaliação das condições clínicas de camundongos infectados por PbA tratados ou não com óleo de peixe rico em DHA. ....64

Figura 12: Avaliação da função hepática e renal de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* ANKA tratados com óleo de peixe rico em DHA.....65

Figura 13: Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica e do desenvolvimento de edema cerebral em camundongos infectados por PbA e tratados com óleo de peixe rico em DHA.....	67
Figura 14: Análise histopatológica dos cérebros dos animais tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectados por PbA. Os cérebros dos animais foram coletados no 7º dpi.....	69
Figura 15: Avaliação da integridade das hemácias de camundongos tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com PbA.....	69
Figura 16: Níveis de citocinas em camundongos infectados por PbA e tratados com óleo de peixe rico em DHA.....	72
Figura 17: perfis anti e pró-inflamatórios em camundongos tratados e infectados com PbA. Razão entre os níveis de IL-10/TNF- $\alpha$ (A) no soro e (B) no cérebro dos animais. * indica diferença significativamente estatística entre os grupos com $p < 0,05$ . dpi = dias pós infecção; PbA = <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	73
Figura 18: quantificação dos níveis de óxido nítrico em camundongos tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectados por PbA. Níveis de óxido nítrico presentes no (A) soro (B) cérebro dos animais. Os resultados são referentes a dois experimentos independentes ( $n = 5$ camundongos/grupo) e os dados são demonstrados por meio das médias $\pm$ SEM. * indica a diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$ . dpi = dias pós-infecção; control = controle, animais não tratados e não infectados; PbA = <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	73
Figura 19: Populações celulares do baço de camundongos tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectados por PbA. (A) células mieloides (CD11b <sup>+</sup> ); (B) monócitos inflamatórios (CD11b <sup>+</sup> Ly6C <sup>hi</sup> Ly6G <sup>-</sup> ); (C) neutrófilos (CD11b <sup>+</sup> Ly6C <sup>+</sup> Ly6G <sup>+</sup> ); (D) células linfoides (TCR <sup>+</sup> ); (E) Células T CD4 (TCR <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ); (F) células T CD8 (TCR <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ). Dados expressos em números absolutos de baços coletados no sétimo dia após a infecção. Os resultados são expressos em média $\pm$ SEM ( $n = 5-6$ animais/grupo). * indica diferença significativa entre os grupos considerando $p < 0,05$ . Control = animais sem infecção e sem tratamento; PbA = <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	75

Figura 20. Contagem de células neuronais nos camundongos infectados com PbA após tratamento com DHA. PbA: *Plasmodium berghei* ANKA ..... 76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informação Nutricional das cápsulas de óleo de peixe, adaptada de acordo com o fabricante (Essential Nutrition).....	51
Tabela 2: Tabela utilizada para realização das avaliações clínicas dos animais após infecção com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	119

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
ALA	Ácido $\alpha$ -linolênico
ALI	Injúria pulmonar aguda
ALT	Alanina aminotransferase
ARDS	Síndrome da angústia respiratória
AST	Aspartato transaminase
BHE	Barreira hematoencefálica
CD36	Cluster de diferenciação 36
CD4	Cluster de diferenciação 4
CD8	Cluster de diferenciação 8
COX-2	Enzima ciclooxygenase 2
CSA	Condroitina sulfatada A
CSP	Proteína de superfície circunsporozoíta
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern</i> – Padrões moleculares associados a danos
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
GPI	Glicofosfatidilinositol
HO-1	Hemoxigenase-1
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1

IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina-10
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
KAHRP	Proteínas ricas em histidina associadas ao <i>knob</i>
LPS	lipopolisacarídeo
LOX	Enzima Lipoxigenase
MC	Malária cerebral
MCE	Malária cerebral experimental
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i> – fator de diferenciação mieloide 88
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i> – armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> – fator nuclear $\kappa$ B
NI	Não infectado
NO	Óxido nítrico
NPD1	Neuroprotetina D1
NRF-2	<i>Nuclear factor erythroid-2 related factor2</i> – fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> – padrões moleculares associados a patógenos

PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PBS	Tampão fosfato salino
PfEMP-1	Proteína de membrana de eritrócito de <i>Plasmodium falciparum</i> 1
SI	Sistema imunológico
RVD1	Resolvina D1
TBS	Tampão TRIS-salino
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Proteína adesiva relacionada a trombospodina
VCAM-1	Proteína de adesão celular vascular-1

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Relatos históricos da distribuição da Malária no Brasil e pelo mundo .....	17
1.2 Distribuição mundial dos casos de malária .....	19
1.3 Ciclo de vida dos parasitos <i>Plasmodium spp.</i> em hospedeiros vertebrados .....	22
1.4 A malária não complicada e seus agravamentos .....	26
1.5 Malária cerebral.....	33
1.6 Resposta imune celular durante infecções maláricas .....	36
1.7 O ômega-3 e sua importância na saúde .....	39
<b>1.7.1 Propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetivas de moléculas ômega-3</b> .....	<b>39</b>
<b>1.7.2 Papel do ômega-3 em doenças parasitárias/infecciosas.....</b>	<b>43</b>
2. JUSTIFICATIVA .....	45
3. OBJETIVOS 47	
3.1 Objetivo geral .....	47
3.2 Objetivos específicos .....	47
4. METODOLOGIA.....	48
4.1 Animais.....	48
4.2 Desenho experimental.....	48
4.2.1 Grupos experimentais .....	48
4.2.2 Tratamento com óleo de peixe DHA .....	50
4.2.3 Infecção experimental com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA .....	51
4.3 Avaliação clínica diária, acompanhamento da parasitemia sanguínea e determinação da curva de sobrevivência. ....	52
4.4 Eutanásia .....	53
4.5 Dosagens bioquímicas e de óxido nítrico .....	54
4.6 Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica .....	54

4.7 Avaliação de edema tecidual.....	55
4.8 Processamento tecidual para inclusão em parafina e microscopia eletrônica de varredura.....	55
4.9 Dosagem de citocinas extraídas do tecido cerebral e soro .....	56
4.9.1 Obtenção de homogenato tecidual para dosagem de citocinas .....	56
4.9.2 Dosagem de citocinas presentes no soro por citometria de fluxo .....	56
4.10 Marcação para fenotipagem celular no baço e cérebro dos animais dos grupos experimentais.....	58
4.12 Análise estatística .....	59
5. RESULTADOS .....	62
6. DISCUSSÃO .....	77
7. CONCLUSÃO.....	84
8. REFERÊNCIAS.....	85
9. ANEXOS .....	118
Anexo I .....	118
Anexo II .....	119
Anexo III .....	120

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Relatos históricos da distribuição da Malária no Brasil e pelo mundo

A malária é uma doença parasitária causada por parasitos protozoários do gênero *Plasmodium*. Seu nome está relacionado às condições em que antigamente acreditavam ser causadoras desta doença, em italiano malária quer dizer “maus ares”, o que remete as regiões pantanosas, onde se acreditava que o ar daquelas regiões era o transmissor desta doença. Conhecida também popularmente como febre quartã, febre terçã, paludismo ou maleita, dentre as várias outras denominações, a malária é uma das doenças mais antigas que se tem registros; provavelmente perpetua há milhares de anos entre os humanos.

O processo evolutivo e onde foram os primeiros locais em que os plasmódios infectantes para humanos se desenvolveram ainda são desafios a serem elucidados pela ciência. Diversos relatos clínicos e moleculares nos dão evidências de que os primeiros registros que se tem conhecimento atualmente da existência de malária datam cerca de 3000 a.C. (COX, 2010; NERLICH, 2016). Em referência as características clínicas registradas, Hipócrates, no século V a.C., relatou a ocorrência de ciclos febris em pacientes; também existem relatos semelhantes a estes em antigos documentos chineses e papiros egípcios, porém estes registros também podem ser relacionados a outras doenças febris, logo tornam-se inespecíficos (COX, 2010; NERLICH, 2016; SALLARES; GOMZI, 2001). Desde o avanço tecnológico no uso da biologia molecular, foi possível utilizar destas ferramentas para investigar a presença do DNA de plasmódios em tecidos moles de corpos mumificados. Assim, em 2010, foi detectada a presença de sequências específicas de DNA plasmodial na múmia do faraó egípcio Tutancâmon e em membros de sua família (HAWASS *et al.*, 2010).

Apesar dos antigos relatos relacionados a doença, os plasmódios foram descritos apenas no final do século XIX, por Alphonse Laveran, após análise do sangue de pessoas infectadas. A partir desta análise, ele observou pequenas estruturas pigmentadas dentro das células sanguíneas em lâminas de sangue por visualização a fresco, e lentes com aumento de apenas 400x (COX, 2010). Por muitos anos, microbiologistas não acreditaram na teoria de Laveran, de que a malária era

causada por protozoários parasitas, e, somente após 7 anos, Laveran foi capaz de convencer microbiologistas renomados como Pasteur, Roux e Koch sobre a descoberta do agente causador da malária. Em 1907, Laveran foi consagrado com o prêmio Nobel de Medicina por sua descoberta (BRUCE-CHWATT, 1981).

Acredita-se que a doença tenha sido trazida para o Brasil por meio da colonização das terras pelos Europeus e pelo tráfico de escravos, visto que estudos indicam que a introdução de *P. falciparum* ocorreu por volta do ano de 1560 (YALCINDAG *et al.*, 2012). Ainda não foram encontrados evidências sobre a existência destes parasitos antes da colonização das Américas (SALLARES; GOMZI, 2001). Logo, com a chegada dos colonizadores e escravos trazidos da África, acrescido da presença de mosquitos vetores no território ocidental, ocorreu a disseminação da doença principalmente entre os povos indígenas (DEANE, 1986).

Fatos históricos pertencentes ao desenvolvimento do Brasil também tiveram importância na disseminação e aumento do número de casos de malária pelo continente, como, por exemplo, a libertação dos escravos, que levou a abandono das áreas antes drenadas, o aumento das atividades econômicas extrativistas e de expansão territorial, como a extração da borracha, e construção de estradas de ferro que levava trabalhadores para o interior do Brasil e para região amazônica (DEANE, 1986).

Durante décadas, milhares de trabalhadores, provenientes de regiões livres da presença dos parasitos, morriam vítimas da doença. Assim, médicos sanitaristas e pesquisadores como Adolf Lutz, Carlos Chagas, Oswaldo Cruz e Arthur Neiva eram constantemente convocados para as diversas regiões endêmicas do país para tentar controlar a doença. Estes pesquisadores foram muito importantes no combate à malária no Brasil, e, apesar de, na época, haver pouco conhecimento sobre a doença, buscavam trabalhar em ações como profilaxia e tratamento dos doentes, o que contribuía imensamente para o controle da doença em tais regiões (GRIFFING *et al.*, 2015).

As medidas profiláticas tomadas perpetuaram por muitos anos e auxiliaram para que a malária fosse praticamente eliminada da região extra-amazônica no Brasil.

Estas medidas foram base para as ações que prevalecem atualmente em Campanhas de Eliminação da Malária para controlar a disseminação da doença.

Mesmo com a existência de campanhas de combate à doença, com o passar dos anos, o número de casos de malária no país tornou-se oscilante. Com o aumento da exploração da floresta e uma migração descontrolada para a região amazônica, o número de casos, com o passar dos anos, aumentou de forma preocupante ao longo do século XX. Esses aumentos logo eram controlados devido a ações de controle vetorial, porém, logo em seguida, com uma nova onda de migração, os números aumentavam novamente. Então, o Sistema de Vigilância em Saúde passou a utilizar o diagnóstico rápido e tratamento da malária como pilares para o controle da disseminação da doença na região, além do uso de DDT nas casas das regiões com maiores focos de malária para controle de vetores (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). A doença se tornou de registro obrigatório em todo território nacional com o objetivo de rastrear e evitar a disseminação da doença.

## **1.2 Distribuição mundial dos casos de malária**

Atualmente a malária ainda tem uma ampla distribuição mundial e ainda é uma doença que demanda grande preocupação em relação a saúde da população. Anualmente são realizados grandes investimentos financeiros com o objetivo de contribuir para eliminação da malária em todo o mundo, e, somente no ano de 2019, foram investidos 3,0 bilhões de dólares. A maior parte deste investimento é voltada para a região Africana, onde se concentra a maioria dos casos de malária do mundo. As áreas de combate à doença que receberam maiores investimentos entre os anos de 2007 e 2018 foram o desenvolvimento de drogas e o financiamento de pesquisas básicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Grandes investimentos continuam sendo necessários para o combate a essa doença que afeta tantas populações pelo mundo. Estimava-se que em 2020 seriam investidos 6.8 bilhões de dólares no combate à malária. Contudo, com a pandemia de COVID-19, iniciada no final de 2019, acredita-se que os investimentos direcionados ao combate à malária foram menores do que o estimado, contribuindo a

curto prazo para o aumento do número de casos mundialmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Apesar de, ao longo das últimas décadas, ter havido grandes investimentos em estratégias de eliminação da doença e, apesar de ter havido uma redução dos casos pelo mundo, ainda foram relatados cerca de 247 milhões de casos clínicos de malária em 2021 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Atualmente 84 países são endêmicos para esta doença, porém cerca de metade dos casos (116,8 milhões de casos) ocorrem em apenas quatro países africanos (Nigéria, República Democrática do Congo, Uganda e Moçambique) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Em 2021 cerca de 619 mil mortes ocorreram devido a malária. Dos óbitos registrados, estima-se que 76% estejam relacionadas a morte de crianças menores de cinco anos, que é a população mais suscetível ao desenvolvimento de malária grave causada por *P. falciparum* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Entre os anos de 2019 e 2021, estima-se que 63 mil mortes tenham ocorrido devido a pandemia COVID-19, visto que foi um período em que os investimentos em saúde foram voltados para a pandemia global e os investimentos no combate à malária foram reduzidos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

A distribuição da malária pelo mundo ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do globo, como pode-se observar na Figura 1.

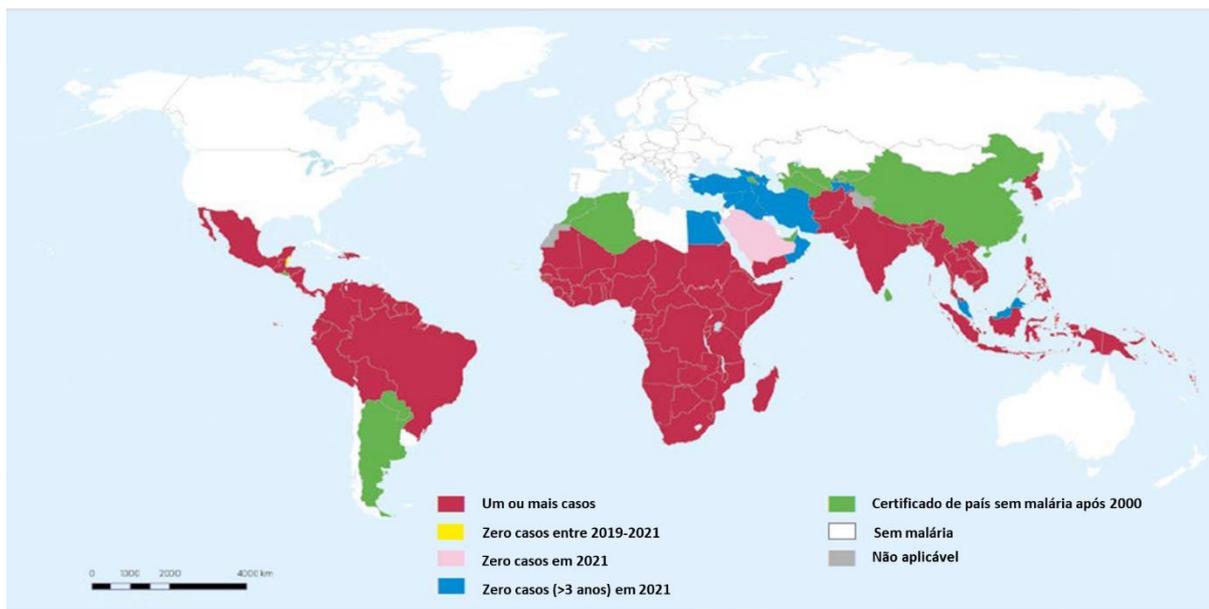
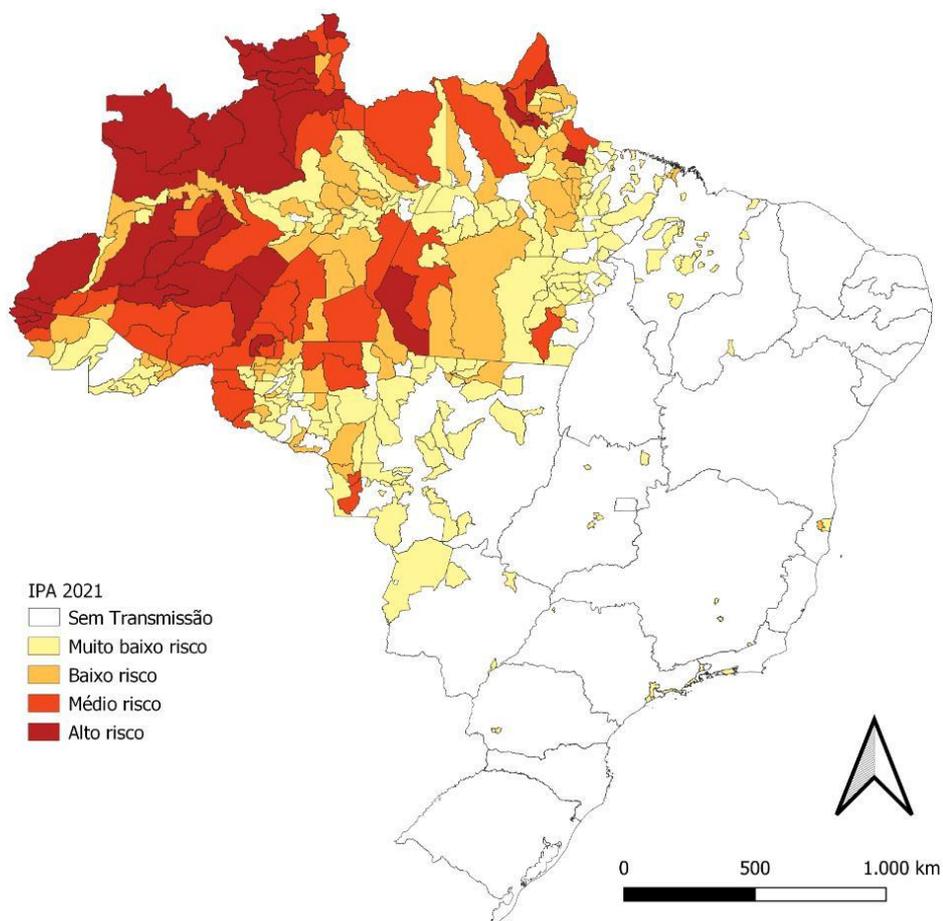


Figura 1: Incidência mundial da malária em 2021. Adaptado de WHO, 2022.

O Brasil é um dos países endêmicos para malária na América do Sul, e junto com Colômbia e Venezuela concentram 86% dos casos ocasionados na região sul-americana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Para combater a doença, a campanha nacional para Eliminação da Malária no Brasil busca não só levar a eliminação da malária em regiões que ainda tem transmissão, mas também prevenir que certas localidades voltem a apresentar novos casos (SANTELLI; CAMILA PINTO DAMASCENO; MARCHESINI, 2016).

Atualmente os casos relacionados a malária no país estão concentrados na região norte, afetando os estados pertencentes a Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Rondônia, Roraima, Pará e Tocantins) (Figura 2). Em 2021, foram registrados 137.857 casos e 49 óbitos em todo país (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2023). Na região extra-amazônica, a maior parte dos casos registrados é decorrente a malária importada de outras localidades, porém, ainda existem alguns relatos de transmissão autóctone em algumas regiões de Mata Atlântica. Em 2018, apenas 537 casos (importados e autóctones) foram registrados nesta região (Ministério da Saúde, SVS, 2020).



Classificação da IPA: Sem transmissão - 0 casos autóctones; Muito baixo risco - IPA <1 caso/1.000 habitantes; Baixo risco - IPA <10 casos/1.000 habitantes; Médio risco - IPA <50 casos/1.000 habitantes; Alto risco - IPA ≥50 casos/1.000 habitantes.

Data de atualização dos dados: 05 de julho de 2022. Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS e Sinan.

Figura 2: Distribuição da malária no Brasil em 2021. Fonte: Ministério da Saúde, 2023. Acesso em 08/03/2023.

### 1.3 Ciclo de vida dos parasitos *Plasmodium spp.* em hospedeiros vertebrados

Os plasmódios são protozoários obrigatoriamente intracelulares que parasitam animais de diversas classes, como aves, répteis e mamíferos. São pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Haemosporida, família *Plasmodiidae*, gênero *Plasmodium*. Seu ciclo de vida é complexo, heteroxênico, envolvendo um hospedeiro invertebrado, no qual realiza seu ciclo sexuado, e um hospedeiro vertebrado, no qual realiza o ciclo assexuado.

Apesar da vasta quantidade de espécies descritas pertencentes ao gênero *Plasmodium*, poucas espécies descritas são capazes de parasitar o ser humano sendo as mais conhecidas: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* (SINGH *et al.*, 2004; SUTHERLAND, Colin J. *et al.*, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Atualmente também vem sendo relatadas infecções em humanos causadas por *P. cynomolgi* e *P. simium* (BRASIL *et al.*, 2017; HARTMEYER *et al.*, 2019), apesar de terem sido descritas inicialmente como espécies específicas de primatas não humanos. Infecções por estas espécies parecem ser raras, e são relatadas como infecções acidentais, porém a frequência destas infecções podem estar sendo subnotificada devido a dificuldades na identificação dos parasitos durante o diagnóstico microscópico (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018; BRASIL *et al.*, 2017).

A transmissão de *Plasmodium spp.* é feita por meio de mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles*. As espécies presentes no Brasil são principalmente *Anopheles darlingi*, *An. albiparvus*, *An. aquasalis* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). A transmissão vetorial da malária se dá por meio da picada destes mosquitos fêmeas, que durante o processo de repasto sanguíneo, injetam junto com sua saliva as formas esporozoítas dos plasmódios na derme do hospedeiro (RIBEIRO, 1987). A saliva dos mosquitos possui substâncias vasodilatadoras que facilitarão a saída dos parasitos da derme e a passagem dos esporozoítos para a corrente sanguínea. Porém, o destino destes parasitos pode ser diverso, estes devem se esquivar da degradação celular devido a sua possível retenção na derme, ou da degradação nos linfonodos caso venham a adentrar nos vasos linfáticos (AMINO *et al.*, 2006). Entretanto, os parasitos, em sua maioria, conseguem sair do seu local de inoculação e alcançar capilares sanguíneos por meio de uma movimentação chamada de *gliding*, uma forma de locomoção na qual consiste em interações associadas a proteína adesiva relacionada a trombospondina (TRAP) presente na superfície celular dos esporozoítos (TROTTEIN; TRIGLIA; COWMAN, 1995).

O período entre a deposição do parasito na derme do hospedeiro e a chegada ao fígado é breve, ocorrendo em até 3 horas após a inoculação (YAMAUCHI *et al.*, 2007). O momento de trânsito do parasito pelo hospedeiro é crítico, dada sua

exposição às defesas do organismo proporcionadas pelo sistema imunológico (SI). Assim, a rapidez com que os esporozoítos alcançam os hepatócitos permite o sucesso da infecção.

Para alcançar os hepatócitos, os esporozoítos precisam atravessar os sinusoides por meio das células de Kupffer (TAVARES *et al.*, 2013). As células de Kupffer são macrófagos teciduais que fazem a ligação entre os sinusoides e os hepatócitos, e, apesar de serem células fagocíticas, os esporozoítos as atravessam ativamente (FREVERT *et al.*, 2005). Devido a ações que o parasito exerce sobre as células do hospedeiro, os mesmos não são degradados, levando a produção de citocinas com perfil anti-inflamatório, por exemplo, e induzindo apoptose destas células, evitando que estas sejam capazes de processar o parasito e apresentar antígenos a células do sistema imunológico, como linfócitos, por exemplo, (LINDNER; MILLER; KAPPE, 2012), favorecendo a chegada dos esporozoítos aos hepatócitos.

Uma vez nos hepatócitos, os esporozoítos passam a apresentar uma característica interessante: são capazes de atravessar e migrar por diversas células até estabelecer em qual célula haverá a formação do vacúolo parasitóforo para sua multiplicação (MOTA *et al.*, 2001). Existem várias hipóteses acerca dos motivos para que esse processo de migração entre as células ocorra: 1: acredita-se que seja para que os parasitos tenham tempo para maturação das organelas do complexo apical que auxiliam no estabelecimento da infecção (LINDNER; MILLER; KAPPE, 2012; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002), ou 2: para que os parasitos encontrem células ricas em moléculas de heparan-sulfato que fazem a troca do modo de migração para o modo de invasão celular dos parasitos por meio da clivagem da proteína circusporozoíta (CSP) presente na superfície dos esporozoítos (COPPI *et al.*, 2007, 2011; COWMAN *et al.*, 2016).

Ao encontrarem a célula em que irão realizar seu desenvolvimento, os parasitos a invadem de forma ativa, com auxílio das organelas do complexo apical e da proteína TRAP, formando uma invaginação na membrana plasmática da célula hospedeira que levará a formação do vacúolo parasitóforo. Este vacúolo é formado por parte da membrana plasmática da célula hospedeira, e, dentro deste, o parasito se desenvolve em trofozoítos. A partir de então, começa a realizar, de forma

assexuada, o processo de esquizogonia tecidual (BANO *et al.*, 2007). Cada trofozoíto dará origem a uma massa nuclear formando o esquizonte tecidual que posteriormente dará origem a milhares de merozoítos, formas infectantes para os eritrócitos. Os merozoítos são liberados dos hepatócitos envoltos em vesículas chamadas de merossomas na corrente sanguínea (STURM *et al.*, 2006). Em infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale* pode haver a formação das formas hipnozoítas; estas são formas latentes do parasito que ficam nos hepatócitos durante meses e são responsáveis por causar a recaída a doença. Quando ativados, estes parasitos iniciam o processo de multiplicação celular e dão continuidade ao ciclo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos invadem rapidamente as hemácias, dificultando a ação do sistema imunológico. Acredita-se que o intervalo entre a saída dos merossomas e a entrada em hemácias sadias ocorra entre 1 a 2 minutos (COWMAN; CRABB, 2006; WEISS *et al.*, 2015). Os merozoítos contam com o auxílio das organelas do complexo apical para realizarem o processo de invasão celular nas hemácias (MILLER *et al.*, 1979) e com proteínas da sua superfície celular como a MSP-1 (proteína 1 de superfície de merozoítos) (BLACKMAN *et al.*, 1990). Logo ao invadir as hemácias, os parasitos iniciam o processo de esquizogonia sanguínea, onde se transformam nas formas jovens e madura dos trofozoítos, posteriormente estes se diferenciam em esquizontes sanguíneos e logo darão origem a centenas de merozoítos que serão liberados na corrente, prontos para invadirem novas hemácias. Este ciclo eritrocítico se repete indefinidamente, aumentando a carga parasitária.

Ainda durante o processo de desenvolvimento dos parasitos no sangue, há a formação dos gametócitos. Os gametócitos são as formas responsáveis pela reprodução sexuada do parasito e sua perpetuação no inseto vetor. Estas formas aparecem no sangue do paciente dias após o aparecimento dos trofozoítos sanguíneos na corrente. Uma vez que os gametócitos permanecem aderidos ao endotélio ou na medula óssea até que seu amadurecimento celular seja completo, esse o surgimento destas formas na corrente podem durar até 10 dias (KNUTTGEN, 1987; SUTHERLAND, C. J.; POLLEY, 2017).

A ilustração resumida do ciclo dos plasmódios em humanos segue na Figura 3.

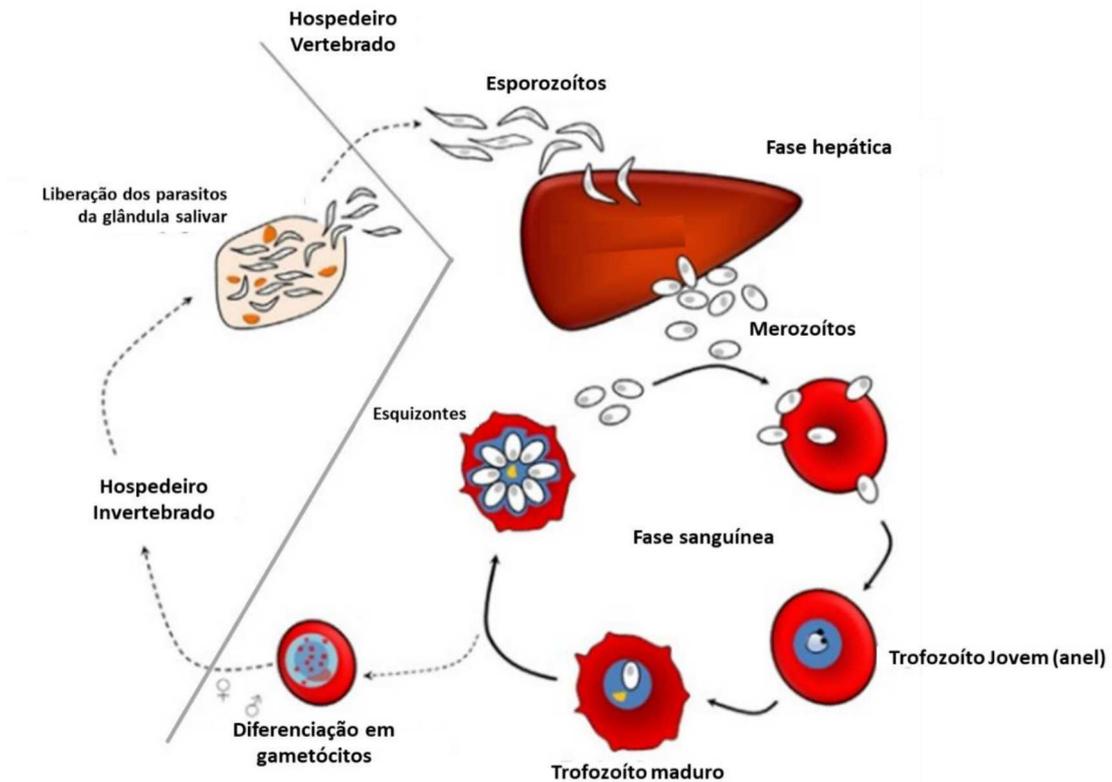


Figura 3: Ciclo biológico das espécies de *Plasmodium* infectantes para o homem. Adaptado de Jensen et al., 2018. As formas esporozoítas do parasito são inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado e dão início ao ciclo hepático, onde há o desenvolvimento de merozoítos liberados na corrente sanguínea e estes são capazes de invadir hemácias, células nas quais há a realização do chamado ciclo sanguíneo, onde há o desenvolvimento de trofozoítos jovens, maduros e a formação de esquizontes, os quais geram novos merozoítos ou então levam a diferenciação das formas gametocíticas dos parasitos. Os gametócitos, quando ingeridos pelo mosquito vetor, realizam o ciclo sexuado do parasito, gerando esporozoítos que darão continuidade ao ciclo de vida em outro hospedeiro vertebrado.

#### 1.4 A malária não complicada e seus agravamentos

Durante a fase hepática não há manifestações clínicas da malária, sendo esta conhecida como a fase silenciosa do ciclo do parasito. Os sintomas relacionados a doença surgem assim que a fase eritrocítica do ciclo dos plasmódios se inicia. Logo, os primeiros sintomas ocorrem após o parasito completar o ciclo hepático, que tem

duração dependente da espécie de parasito infectante sendo em média de 10 a 14 dias. Após a invasão das hemácias, os parasitos levam cerca de 24 horas (infecções por *P. knowlesi*), 48 horas (infecções causadas por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*) ou 72 horas (infecções por *P. malariae*) para completarem seu desenvolvimento, e a partir do rompimento das hemácias infectadas, ocorre a liberação dos parasitos e seus metabólitos na corrente sanguínea (CENTRALS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2021a; GOLGI, 1889, *apud* ANSTEY *et al.*, 2012).

Dois exemplos de metabólitos liberados durante o rompimento das hemácias são: glicofosfatidilinositol (GPI) e hemozoína. Moléculas de GPI estão presentes na superfície celular de protozoários e são capazes de estimular respostas imunes nos hospedeiros. Desse modo, uma vez que as hemácias parasitadas são rompidas, estas proteínas são liberadas e expostas ao SI, estimulando sua ativação via fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), promovendo uma resposta inflamatória por meio de macrófagos e produção de citocinas (TACHADO *et al.*, 1995). A hemozoína, também conhecida como pigmento malárico, é resultado da metabolização da hemoglobina pelos parasitos, que transformam os grupamentos heme em uma substância não tóxica para seu desenvolvimento (ARESE; SCHWARZER, 1997). Porém, apesar de ser inerte e não causar danos aos parasitos dentro das hemácias, a hemozoína é uma substância pirogênica que, quando liberada na corrente sanguínea, estimula monócitos a produzir TNF- $\alpha$  e causar febre, junto com a ativação de diversas outras células e a produção de citocinas (SHIO *et al.*, 2010).

A febre alta, em torno de 41°C, é a característica mais comum entre os sintomas descritos para a malária. Geralmente se apresenta de forma cíclica de acordo com o intervalo de tempo de desenvolvimento dos parasitos dentro das hemácias infectadas. Esses ciclos febris, conhecidos como “acesso malárico” ou “paroxismo”, são acompanhados de um grande mal-estar, tremores e calafrios, cefaleia, náusea e vômitos (KITCHEN, 1949, *apud* ANSTEY *et al.*, 2012). É interessante destacar que, uma vez que o acesso malárico cessa, o paciente sente-se bem até que o próximo ciclo de reprodução do parasito esteja completo e haja nova liberação dos metabólitos do parasito na corrente sanguínea, iniciando novamente o acesso malárico.

Caso o paciente venha a buscar auxílio médico, assim que apresentar os primeiros sintomas, e receba o tratamento adequado, a cura da doença será alcançada. Porém, em alguns casos em que o tratamento não é eficaz, ou não é realizado, ou em casos em que o diagnóstico da doença é tardio, ou ainda devido à falta de imunidade natural a infecção, a doença pode evoluir para a forma grave. Os agravamentos da malária podem ocorrer em infecções causadas por *P. vivax*, *P. knowlesi* ou *P. falciparum* sendo muito mais frequente nas infecções causadas por essa última espécie.

Os quadros graves relacionados a malária causada por *P. vivax* tem como característica a presença de dificuldade respiratória, falência renal, icterícia, falência hepática, anemia grave, choque e coma. Esses agravamentos geralmente ocorrem em pacientes que possuem comorbidades prévias, como má nutrição, pacientes portadores do HIV e outras infecções. Também são grupos de risco para o desenvolvimento de doença grave crianças e recém-nascidos; estes podem ir a óbito se não tratados adequadamente (KOCHAR *et al.*, 2010; LACERDA *et al.*, 2012; MILNER, 2018; POESPOPRODJO *et al.*, 2010; TJITRA *et al.*, 2008).

Já em infecções por *P. knowlesi*, as condições graves são as mais fatais, e, apesar de poucos casos serem relatados anualmente, sua taxa de mortalidade é maior do que a observada em *P. falciparum* (em torno de 3% nos pacientes infectados por *P. knowlesi*) (ANTINORI *et al.*, 2013). O agravamento das infecções maláricas causadas por *P. knowlesi* envolvem o desenvolvimento de injúria renal, dificuldade respiratória que pode se desenvolver em síndrome respiratória aguda, necessitando da utilização de ventilação mecânica pelo paciente, choque e trombocitopenia que pode levar a ocorrência de quadros hemorrágicos (RAJAHRAM *et al.*, 2012).

As infecções por *P. falciparum* são as responsáveis pelo maior número de casos graves relacionados a malária, principalmente na África subsaariana. Moradores de áreas de alta endemicidade desenvolvem imunidade natural conforme se expõem a infecção ao longo dos anos, logo apresentam a chamada imunidade clínica. Nesses indivíduos, os níveis de parasitos circulantes podem estar reduzidos a níveis sub-microscópicos mas nunca são negativados pela atuação do SI. Dessa forma, nessas localidades, o agravamento da malária ocorre principalmente em

crianças com menos de 5 anos de idade, visto que estas, até então, não foram capazes de desenvolver uma resposta imunológica efetiva contra a doença. Cerca de dois terços dos casos fatais de malária estão relacionados a infecções em crianças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b). A taxa de mortalidade em crianças, ocasionadas pelo desenvolvimento de malária cerebral, é de 10 a 20% (MILNER, 2018) e as crianças que sobrevivem a este quadro podem apresentar diversos déficits cognitivos ao longo da vida, prejudicando seu desenvolvimento (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018; BRIM *et al.*, 2017).

Além das crianças, mulheres que estão tendo sua primeira gestação e indivíduos imunocomprometidos também fazem parte do grupo de risco para malária grave (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b). Moradores de regiões não endêmicas também estão sujeitos a desenvolverem as formas graves da infecção, visto que não possuem imunidade natural adquirida com exposição prévia ao parasito. Em adultos, as principais manifestações clínicas graves da malária são o desenvolvimento de falência renal, síndrome da angústia respiratória em adultos (ARDS) e falência hepática, enquanto em crianças a malária cerebral, anemia grave, hipoglicemia, bem como o desenvolvimento de injúria pulmonar aguda (ALI) e convulsões são os quadros graves mais frequentemente observados (MILNER, 2018; TAYLOR *et al.*, 2012).

Um resumo sobre os principais sintomas clínicos apresentados pelos pacientes durante o agravamento da malária é representado na figura 4. Pode-se observar que de acordo com a idade há uma alteração nas características clínicas apresentadas pelos pacientes, como por exemplo, a presença de quadros convulsivos e anemia, que são muito mais frequentes em crianças do que em adultos.

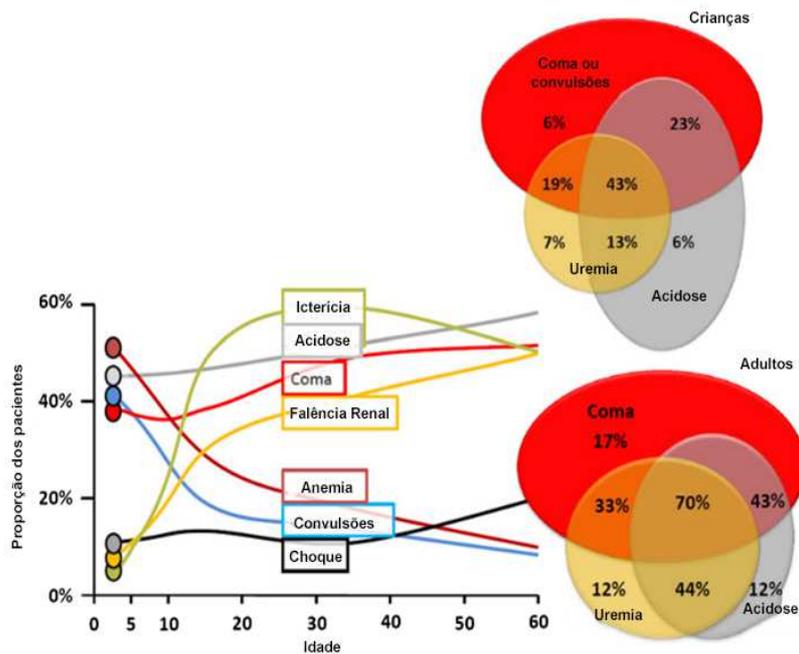


Figura 4: Representação gráfica da proporção de pacientes que apresentam os sintomas clássicos da malária. Adaptado de WHO Severe Malaria, 2014.

A anemia grave durante as infecções maláricas ocorre devido a ação de diversos fatores inerentes ao hospedeiro e ao parasito, sendo relativamente comum entre crianças e adultos infectados especialmente com *P. vivax*. Sabe-se que para cada hemácia destruída durante a infecção por *P. falciparum*, 35 são destruídas durante a infecção por *P. vivax*. Durante a infecção, os parasitos rompem as hemácias infectadas levando a destruição das mesmas, entretanto, sabe-se que este mecanismo não é significativo no desenvolvimento da anemia. O principal mecanismo da anemia grave é a destruição das hemácias, parasitadas ou não, no baço dos indivíduos infectados (ABDALLA, 1988); esta destruição ocorre devido a alterações na membrana das hemácias infectadas, como mudanças na forma das células e também devido a expressão de proteínas do parasito, onde se ligam anticorpos que fazem a mediação da fagocitose por células presentes no baço (ABDALLA, 1988). A adsorção de antígenos e metabólitos dos parasitos na membrana da hemácia não infectada também é um fator importante no desenvolvimento da anemia grave, fazendo com que estas hemácias sadias sejam destruídas pelo baço (ENGWERDA; BEATTIE; AMANTE, 2005). Além disso, a produção de citocinas e a produção de hemozoína pelos parasitos são fatores que contribuem no desenvolvimento da

anemia, afetando a produção de células na medula óssea, que leva a uma diseritropoiese durante o quadro clínico da doença (CASALS-PASCUAL *et al.*, 2006; KNUTTGEN, 1987; RUDIN *et al.*, 1997). A anemia grave ainda pode levar ao desenvolvimento de quadros de hipóxia tecidual e acidose metabólica (WHITE, 2018). Clinicamente, a anemia é considerada grave quando os níveis de hemoglobina estão abaixo de 5 mg/dl, os quais podem ser reestabelecidos a partir de transfusões sanguíneas e logo após o início do tratamento com o uso de medicamentos anti-plasmodiais (WHITE, 2018).

A injúria respiratória é ocasionada pela adesão dos eritrócitos parasitados ao endotélio capilar dos alvéolos, que leva ao aumento da frequência respiratória para tentar compensar a reduzida troca gasosa ocasionada pela obstrução dos capilares pelas células parasitadas (TAYLOR *et al.*, 2012). A patologia pulmonar também pode estar relacionada ao desenvolvimento de resposta imunológica local devido à presença das hemácias parasitadas. Nesse sentido já foram observados em autópsias a presença de células com hemozoína fagocitada, indicando a presença de uma resposta imunológica robusta nos capilares dos alvéolos pulmonares (TAYLOR *et al.*, 2012). Também foram observadas a presença de edema pulmonar e hemorragias durante autópsias em humanos (TAYLOR *et al.*, 2012). Durante a síndrome respiratória aguda grave (ARDS), a respiração do paciente se torna mais rápida e profunda, demonstrando dificuldade respiratória, podendo haver indícios de cianose e chiado nos pulmões durante o processo de expiração (WHO, 2014). Durante a malária grave, o quadro de injúria pulmonar pode auxiliar no desenvolvimento da acidose metabólica, agravando o quadro do paciente.

A acidose metabólica é um dos agravamentos causados durante o quadro de malária grave e é um forte prognóstico de morte (DAY *et al.*, 2000). Esta tem como característica o acúmulo principalmente de ácido láctico, derivado da quebra da glicose por via anaeróbica (DAY *et al.*, 2000). A obstrução dos capilares por células parasitadas leva a falta de oxigenação tecidual, logo inicia-se o processo de respiração anaeróbica pelas células (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018; DAY *et al.*, 2000). O consumo de glicose pelo parasito também é realizado de forma anaeróbica, mas acredita-se que este seja insuficiente para gerar lactato suficiente para a acidificação do metabolismo (ENGLISH *et al.*, 1997; VAN DER JAGT *et al.*,

1990). Esse acúmulo de ácidos no organismo leva a diversos danos teciduais, visto que inibe funções enzimáticas devido a alterações em sua estrutura, além de alterar estruturas de demais proteínas necessárias para o metabolismo. Ainda, a acidose metabólica é capaz de alterar funções cerebrais e alterar a absorção da insulina, levando a quadros de hipoglicemia, o qual é observado principalmente em crianças (DAY *et al.*, 2000).

Durante o processo de falência renal, quadro comumente observado em adultos durante a malária grave, a homeostase é comprometida devido a incapacidade de levar a um balanço ácido-base pela produção de íons de bicarbonato, influenciando no aumento da concentração de ácidos no organismo (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018; DAY *et al.*, 2000; revisto por WASSMER; GRAU, 2016). A falência renal pode se desenvolver devido a ocorrência de diversos fatores como a deposição de complexos imunológicos nos glomérulos (revisto por WASSMER; GRAU, 2016), devido a hemólise das hemácias parasitadas e não parasitadas, hipóxia tecidual causada pela adesão endotelial de hemácias parasitadas por *P. falciparum* e ao desenvolvimento de sepse e icterícia, causada pelo aumento de bilirrubina no sangue (MATHEW; GEORGE, 2011).

Em relação à malária placentária, esta ocorre enquanto mulheres grávidas pela primeira vez são expostas a infecção por *P. falciparum*. Durante a infecção, os parasitos expressam na superfície dos eritrócitos parasitados clones específicos da *proteína 1 de membrana do eritrócito de P. falciparum* (PfEMP-1) que se ligam à condroitina sulfatada A (CSA) expressos na placenta, especialmente nos espaços intervilosos e no sincitiotrofoblasto (ROGERSON *et al.*, 1995). Em relação aos danos que podem ser causados devido a esse quadro clínico, pode haver prejuízos no desenvolvimento fetal como crescimento intrauterino alterado, que leva a possibilidade de nascimento prematuro do bebê, bem como o nascimento com peso abaixo do esperado ou a morte da criança, além de poder levar o desenvolvimento de anemia e a morte da mãe devido a ocorrência de hemorragias (CENTRALS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2021b). Atualmente já foi observado que este agravamento ocorre principalmente em mulheres primígravidas devido a sua suscetibilidade a infecção por parasitos que se ligam especificamente a CSA, devido

à ausência de anticorpos contra essas linhagens clonais do parasito (FRIED; DUFFY, 1996 e 2017). Interessante ressaltar que, apesar de infectadas, as grávidas não apresentam sintomas característicos da malária; seus níveis de parasitemia sanguínea são baixos e quase não são observados parasitos em circulação, visto que os parasitos se concentram na placenta, onde se encontram aderidos (revisto por SCHOFIELD; GRAU, 2005). Desta forma, o diagnóstico da malária placentária é difícil de ser realizado (revisto por SCHOFIELD; GRAU, 2005).

Como relatado nos casos citados de agravamento da malária, a adesão dos parasitos ao endotélio de capilares sanguíneos possui grande importância no processo de patogênese destas formas graves. Não diferente do observado nos demais quadros, a adesão endotelial das hemácias infectadas também tem grande importância no quadro de malária cerebral (MC), abordado a seguir.

## **1.5 Malária cerebral**

A malária cerebral é um quadro clínico considerado de maior gravidade devido a suas altas taxas de mortalidade de pacientes todos os anos. Cerca de 20% das crianças são acometidas com esse quadro grave, causando altas taxas de mortalidade e morbidade nessa população (MOLYNEUX *et al.*, 1989; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Entre as principais características, podemos citar o rápido desenvolvimento do quadro clínico, levando os pacientes ao coma em menos de 24h após o aparecimento dos primeiros sintomas. Além de levar os pacientes ao coma, há o aumento da pressão intracraniana, convulsões, confusão mental, ataxia e paralisia parcial (BOIVIN *et al.*, 2007; IDRO; JENKINS; NEWTON, 2005).

A patogenia da malária cerebral ocorre inicialmente a partir da adesão de eritrócitos parasitados no endotélio de micro vasos da circulação sanguínea cerebral. Como mencionado anteriormente, os parasitos expressam proteínas na superfície das hemácias infectadas, permitindo que estas sejam aderidas à superfície endotelial dos capilares sanguíneos. O processo de adesão endotelial é de extrema importância para as formas assexuadas do parasito, visto que é entendido como um mecanismo que

permite que os mesmos escapem de serem destruídos pelo baço (CHOTIVANICH *et al.*, 2002; ENGWERDA; BEATTIE; AMANTE, 2005).

A principal proteína envolvida no processo de adesão celular expressa por *P. falciparum* na superfície das hemácias parasitadas é a proteína de superfície de membrana de eritrócito PfEMP-1 (BARUCH *et al.*, 1997). Esta proteína é codificada por genes *var*, ou seja, são amplamente variáveis geneticamente, apresentando fenótipos distintos (GARDNER *et al.*, 2002). Estas proteínas, juntamente com as proteínas ricas em histidina associadas ao *knob* (KAHRP), compõem os chamados *knobs*, protuberâncias que ocorrem na membrana plasmática das células parasitadas devido a expressão destas proteínas derivadas dos parasitos (CUTTS *et al.*, 2017). Os “knobs” são as estruturas responsáveis pela adesão destas células a receptores presentes no endotélio de capilares sanguíneos do hospedeiro, como CD36, ICAM-1, VCAM-1 e CSA (BERENDT *et al.*, 1989; FRIED; DUFFY, 1996; OCKENHOUSE *et al.*, 1988; ROGERSON *et al.*, 1995), levando a patogenia de diversos órgãos de acordo com a expressão destes ligantes.

A adesão de células parasitadas ao endotélio vascular cerebral compõe o chamado “processo mecânico” podendo resultar na obstrução dos microvasos em com conseqüente evolução da doença para o quadro de MC (BERENDT; TUMER; NEWBOLD, 1994). Além da adesão endotelial de células parasitadas, a formação de rosetas e de aglomerados celulares (chamados *clumpings*), também contribuem para a obstrução celular (PAIN *et al.*, 2001). A obstrução local dos capilares leva a um impedimento do fluxo sanguíneo local, o que pode levar a hipóxia do tecido, aumento da pressão intracraniana com edema cerebral, ativação de células do endotélio, rompimento da barreira hematoencefálica (BHE), hemorragias e um desequilíbrio no processo de coagulação (WASSMER *et al.*, 2008).

Além da presença de eritrócitos obstruindo vasos da microcirculação cerebral, já foram descritas a presença de leucócitos nesses capilares, tanto em animais experimentais quanto em humanos (DE SOUZA *et al.*, 2010). A presença de leucócitos aderidos ao endotélio cerebral é um fator importante visto que, apesar dos mecanismos patológicos ainda não serem totalmente elucidados, o processo inflamatório local exacerbado causa danos à barreira hematoencefálica, rompendo-a

e agravando o quadro clínico do paciente. Além de plaquetas, as células TCD8<sup>+</sup> estão presentes e possuem uma ação altamente importante no processo patogênico visto que, com sua ação citotóxica, leva a liberação de granzimas e perforinas que causam a morte de células do endotélio e também podem causar danos a neurônios (EEKA; PHANITHI, 2018; HAQUE *et al.*, 2011). Junto da ação de células inflamatórias, obstrução da microvasculatura e ativação endotelial, há a ação de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que também causam danos à barreira hematoencefálica e o aumento sistêmico da produção de citocinas ainda teria influência no desenvolvimento da MC (MARTINS; CARVALHO; DANIEL-RIBEIRO, 2009).

Apesar de haver a recuperação de grande parte dos pacientes com MC, estes ainda podem desenvolver sequelas graves que podem permanecer durante toda a sua vida. Déficits cognitivos, déficit de atenção, cegueira, prejuízos à linguagem e a capacidade motora são algumas das sequelas que podem ocorrer, principalmente em crianças (BOIVIN *et al.*, 2007; BRIM *et al.*, 2017; DE SOUSA *et al.*, 2018; IDRO; JENKINS; NEWTON, 2005).

A MC é um quadro complexo, visto que há grandes variações nas características apresentadas pelos pacientes. Dificuldades na compreensão do mecanismo de patogenia deste quadro clínico ocorrem devido às barreiras éticas existentes. Acredita-se que fatores como idade e variação genética possuam algum papel no desenvolvimento dos quadros clínicos. Além disso, é questionável a obrigatoriedade da presença de células parasitadas aderidas ao cérebro ou não para o desenvolvimento deste agravamento (DE SOUZA *et al.*, 2010). Estudos em humanos ainda ocorrem por meio de autópsias em pacientes (DOROVINI-ZIS *et al.*, 2011), ou pela utilização de ressonância magnética (MOLYNEUX *et al.*, 1989; POTCHEN *et al.*, 2018). Desta forma, para melhor compreender o desenvolvimento da patogenia e aprimorar tratamentos relacionados a MC, o uso de modelos animais vem sendo amplamente utilizado ao longo das últimas décadas.

O tratamento atual para a MC conta com a utilização de artesunato por via intravenosa, porém, este medicamento atua apenas no combate aos parasitos, o que aumenta a chance de sobrevivência do paciente em até 80%. Sabendo-se que a MC é

uma síndrome causada por diversos fatores, atualmente buscam-se alternativas ao tratamento com antimaláricos, para que seja possível associá-lo a outras drogas que possam auxiliar na redução de taxas de mortalidade e morbidade, além de diminuir a ocorrência de possíveis sequelas. Desta forma, diversos estudos clínicos e pré-clínicos vêm sendo realizados para o desenvolvimento de terapias adjuvantes, voltadas para amenizar os danos neurológicos e inflamatórios.

Diversas abordagens podem ser utilizadas com foco em amenizar os danos causados durante a MC, como, por exemplo, medidas que venham a diminuir a pressão intracraniana (por exemplo, com o uso de manitol em pacientes em coma) (NAMUTANGULA *et al.*, 2007), que impeçam a adesão do parasito ao endotélio vascular dos capilares sanguíneos (WILSON *et al.*, 2013), ou ainda com alvo no SI com o uso de anti-inflamatórios (WARRELL *et al.*, 1982) ou de anticorpos monoclonais (VAN HENSBROEK *et al.*, 1996).

Estudos recentes voltados para a utilização da curcumina em camundongos demonstraram a capacidade desse composto em inibir a resposta inflamatória em camundongos C57BL/6 impedindo o desenvolvimento de MC após infecção por *P. berghei* ANKA (DENDE *et al.*, 2015). Da mesma forma, foi observada uma diminuição da resposta inflamatória em camundongos após a utilização de vitamina D associada a um antimalárico, e menor dano a barreira hematoencefálica nos animais (DWIVEDI *et al.*, 2016).

Entretanto, muitos desses estudos ainda não apresentam eficácia e não são recomendados pela Organização Mundial da Saúde para tratamento dos doentes, segundo o Guia de Tratamento para a Malária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Logo a busca por novas substâncias capazes de melhorar o prognóstico da MC são necessários.

## **1.6 Resposta imune celular durante infecções maláricas**

Durante as infecções plasmodiais, diversos mecanismos de defesa do sistema imunológico são ativados, desde o momento da entrada do parasito no

hospedeiro até este alcançar o ciclo eritrocítico. Uma vez inseridos na derme do hospedeiro pela picada do inseto vetor, os esporozoítos de plasmódios são reconhecidos por células imunes presentes na derme, como por exemplo, neutrófilos e macrófagos (AMINO *et al.*, 2006; DEMEURE *et al.*, 2005). Os esporozoítos, apesar da sua capacidade de alcançar a corrente sanguínea em poucas horas, podem ser reconhecidos e destruídos por monócitos, por exemplo, e, uma vez fagocitados, seus antígenos podem ser apresentados à linfócitos T CD4 e T CD8 ativando essas células (CHAKRAVARTY *et al.*, 2007; RADTKE *et al.*, 2015). Células dendríticas também podem realizar apresentação de antígenos a linfócitos caso os esporozoítos sejam drenados para o linfonodo mais próximo ao local da picada e sejam então fagocitados por estas células (Amino *et al.*, 2006; Chakravarty *et al.*, 2007).

Em seguida, os plasmódios, ao chegarem ao fígado, podem invadir células de Kupffer sem que estas sejam ativadas. Esse mecanismo envolve diversos receptores e organelas do parasito que fazem com que estes possam escapar da resposta imunológica sem que haja sua destruição (AMINO *et al.*, 2006). Ainda em relação ao ciclo hepático da infecção, os plasmódios possuem outro mecanismo para escapar da sua destruição pelo sistema imunológico, que é a formação de bolsas protetoras de merozoítos, as chamadas merossomas. Estas impedem que os merozoítos sejam reconhecidos por células teciduais e destruídos antes de alcançarem a corrente sanguínea (COWMAN; CRABB, 2006; STURM *et al.*, 2006). Uma vez na corrente sanguínea, os parasitos são capazes de invadir as hemácias rapidamente, deste modo, anticorpos, proteínas do sistema complemento e células imunes não conseguem destruir estas células e impedir que haja a continuação da infecção (STURM *et al.*, 2006). Uma vez dentro da hemácia, os parasitos apresentam na superfície destas células diversas proteínas do parasito, além de produzirem metabólitos no interior das hemácias, como GPI e hemozoína, por exemplo. (ARESE; SCHWARZER, 1997; SHIO *et al.*, 2010; TACHADO *et al.*, 1995). Deste modo, quando novos merozoítos são formados, ocorre o rompimento das hemácias, e ocorre a liberação destes metabólitos produzidos pelo parasito. Estes são reconhecidos por monócitos circulantes, células dendríticas, neutrófilos, e quando estas células são ativadas, iniciam a produção de componentes do sistema imunológico de perfil pró-inflamatório, com a produção de citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  que estimulam a ativação

de células NK, linfócitos, células dendríticas, além de estimularem a produção de moléculas como o óxido nítrico, na tentativa de combater a proliferação do parasito no sangue (BURRACK; HART; HAMILTON, 2019; PODOBA; STEVENSON, 1991; SCHOFIELD; GRAU, 2005; SHIO *et al.*, 2010).

Como mencionado, parasitos da espécie *P. falciparum* podem expressar na superfície das hemácias proteínas como a PfEMP-1 que são capazes de fazer com que as hemácias parasitadas sejam aderidas a receptores de ICAM-1 no cérebro, e outros como CD36 e CSA em demais órgãos, e assim podem causar localmente a ativação das células da micróglia no cérebro (PASLOSKE; HOWARD, 1994; STORM; CRAIG, 2014). Essa ativação de macrófagos teciduais faz com que seja iniciada a produção de citocinas, quimiocinas e recrutamento das demais células com o objetivo de eliminar o parasito da circulação. Por outro lado, todo o recrutamento de células e moléculas de perfil pró-inflamatório podem levar a uma resposta imunológica local exacerbada e causar danos ao tecido. O recrutamento de monócitos e células NK levam a produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  (BURRACK; HART; HAMILTON, 2019; CHEN; ZHANG; SENDO, 2000; RÉNIA *et al.*, 2006). As células T CD8 citotóxicas também são recrutadas para o local da adesão das hemácias parasitadas no cérebro e parecem exercer papel essencial no desenvolvimento de quadros graves da malária, especialmente da MC; a chegada destas ao local da adesão tecidual leva a secreção de granzimas e perforinas, que causam morte de células e auxiliam no rompimento da barreira hematoencefálica (HAQUE *et al.*, 2011). Células T CD4, principalmente as Th1, são produtoras de citocinas que alimentam o ciclo de recrutamento celular no combate ao parasito (GOOD *et al.*, 2005).

O baço também é um órgão de grande importância na resposta à infecção malárica. Hemácias parasitadas e não parasitadas são destruídas por este órgão e o reconhecimento e destruição destas leva a expansão clonal e migração de diversas células como linfócitos, células dendríticas, macrófagos, células NK e neutrófilos (CHOTIVANICH *et al.*, 2002).

Deste modo, sabendo que a resposta imunológica à malária é potente e que pode gerar danos além dos danos já causados pelos parasitos, a modulação da resposta imunológica para diminuir o potencial inflamatório durante quadros graves,

além da eliminação dos parasitos do organismo, pode ser um trunfo para a sobrevivência de pacientes e redução das sequelas causadas pela doença.

## **1.7 O ômega-3 e sua importância na saúde**

### **1.7.1 Propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetivas de moléculas ômega-3**

Os benefícios do consumo de ômega-3 na alimentação humana já são observados há muitos anos, e atualmente, vem recebendo grande destaque devido ao seu grande potencial anti-inflamatório no tratamento de diversas doenças. Entretanto, seu consumo pelas populações ocidentais é cada vez mais raro, devido ao baixo consumo das principais fontes de ômega-3, como o consumo de peixes e frutos do mar (revisto por SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018; VANNICE; RASMUSSEN, 2014). Por outro lado, atualmente, devido à grande ingestão de alimentos industrializados, pobres em nutrientes, óleos vegetais, como o óleo de soja, há um maior consumo de moléculas ômega-6 presente na alimentação das populações de regiões ocidentais. Isto influencia no processo de metabolização dos ácidos graxos a nível celular, fazendo que haja uma desregulação dos níveis de moléculas de ômega-6 em relação às moléculas de ômega-3 (SIMOPOULOS, 2002).

Os ácidos graxos, que pertencentes a família ômega-3, são ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), de cadeia longa, que possuem uma ligação dupla no terceiro carbono final da cadeia, em oposição ao grupamento metil (revisto por SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018). Os ácidos graxos ômega-3 possuem diversas funções, dentre elas, atuam como importantes componentes responsáveis por gerar fluidez na membrana plasmática de células (HASHIMOTO; HOSSAIN, 2018) e podem participar de algumas vias metabólicas como na produção de hormônios e na resposta imunológica (CALDER, 2010). Moléculas de ômega-3 são consideradas essenciais na dieta de mamíferos uma vez que estes animais não possuem as enzimas  $\Delta 12$ - e  $\Delta 15$ -desnaturases para introduzir uma ligação dupla na cadeia que levarão a formação destes ácidos graxos no organismo (BURDGE; CALDER, 2015). Desta forma, o consumo de alimentos ricos em ômega-3 é essencial para a nutrição uma vez que,

apesar de não serem sintetizados, os ácidos graxos desta família podem ser degradados e são essenciais para o organismo (FAO, 2010).

Em relação ao metabolismo das moléculas de ômega-3, os principais produtos da elongação do ácido  $\alpha$ -linolênico, que compõe a classe dos ômega-3, são o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5  $\Omega$ -3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6  $\Omega$ -3) (revisto por CALDER, 2016) (Figura 5), sendo o DHA a principal molécula lipídica na formação do sistema nervoso central de mamíferos.

Estudos já demonstraram o importante papel do DHA pro processo de formação do sistema neurológico e na formação da retina em bebês, ainda na vida intrauterina e até os 2 anos de idade (CETIN; KOLETZKO, 2008; HELLAND *et al.*, 2008; MARCHESELLI *et al.*, 2003; SCOTT; BAZAN, 1989; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018), bem como seu papel neuroprotetor em doenças neurodegenerativas (BAZAN, 2005; BRAZ-DE-MELO *et al.*, 2019; KIM, Hee-Yong, 2014), na redução da neuroinflamação (LALANCETTE-HÉBERT *et al.*, 2011) além de atuar, juntamente ao EPA, nos processos de diminuição da resposta pró-inflamatória a partir da modulação de prostaglandinas (REES *et al.*, 2006), da inibição da formação de inflamassomas (YAN *et al.*, 2013) e diminuição da produção de ROS reduzindo o estresse oxidativo (SAKAI *et al.*, 2017).

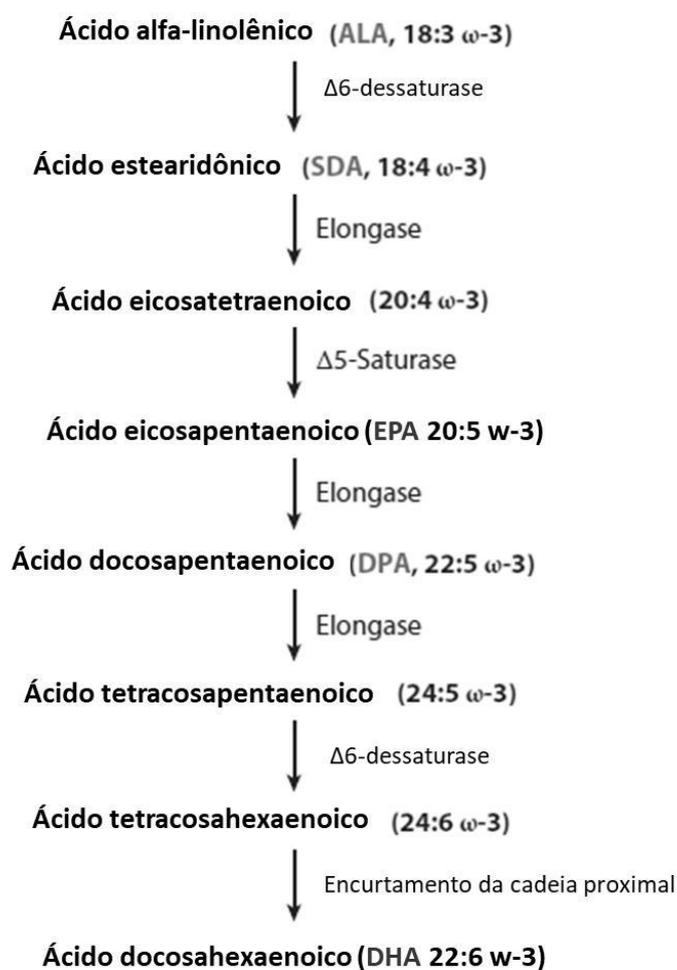


Figura 5. Esquemática da via metabólica de lipídeos da família ômega-3. O processo de derivação de lipídeos é realizado com a participação de diversas enzimas e dá origem a ácidos graxos importantes para os organismos. (Adaptado de SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018)

Uma vez que há o aumento do consumo de moléculas de ômega-3, seja pela suplementação com o consumo de cápsulas contendo óleo de peixe ou pelo consumo de alimentos ricos nestes nutrientes, haverá uma diminuição da razão entre o número de moléculas de ômega-6 em relação as de ômega-3, principalmente devido a presença do ácido  $\alpha$ -linolênico, havendo desta forma maior disponibilidade de ômega-3 para ser metabolizado. Em relação aos processos bioquímicos relacionados ao ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\Omega$ -3), a sua metabolização leva a uma maior disponibilidade de EPA e DHA na membrana plasmática (CALDER, 2015; FAO, 2010). Estas, uma vez na presença de estímulos, ou injúria tecidual, possuem atividade anti-inflamatória quando oxidados pela enzima COX-2 (ciclooxigenase-2) e geram resolvinas e

protetinas que vão atuar evitando maiores danos teciduais (HONG, Song *et al.*, 2003; MARCHESELLI *et al.*, 2003; SERHAN *et al.*, 2002) além de ativar vias como PPAR- $\gamma$  (KONG *et al.*, 2010; KREY *et al.*, 1997), inibir a ativação da via inflamatória NF $\kappa$ B (KONG *et al.*, 2010; NOVAK *et al.*, 2003) e expressar receptores ICAM-1 e VCAM-1 (HUGHES *et al.*, 1996; MILES *et al.*, 2001). As protetinas e resolvinas produzidas são capazes de diminuir a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 *in vivo* e *in vitro* (KONG *et al.*, 2010).

Os efeitos da metabolização do ácido  $\alpha$ -linolênico e, conseqüentemente do DHA, citados acima, são encontradas em estudos sobre o papel do DHA durante derrames (PATRICK, 2019; ZHANG *et al.*, 2011). Já foi observado que a suplementação com DHA levou ao aumento da perfusão tecidual com melhora na circulação do sangue, e melhora nas regiões com isquemia e hemorragias teciduais (HONG, Sung Ha *et al.*, 2015; YIN *et al.*, 2016). Durante o quadro isquêmico, a metabolização do DHA leva a produção de neuroprotetina D1 (NPD1) e resolvinas-D1 (RvD1). As NPD1 são relacionadas com o baixo recrutamento de leucócitos e a diminuição da ativação de NF $\kappa$ B (MARCHESELLI *et al.*, 2003; SCHWAB *et al.*, 2007), enquanto as RvD1 também possuem características anti-inflamatórias e dificultam o dano no tecido cerebral pela IL-1 $\beta$  induzida por TNF- $\alpha$  (SERHAN *et al.*, 2002).

Diversos estudos demonstraram que a baixa presença de DHA no cérebro está associada com desordens como a doença de Alzheimer e que o uso da suplementação com DHA levou a melhora nesse quadro clínico (BELKOUCH *et al.*, 2016; MORRIS *et al.*, 2003; PUSKÁS *et al.*, 2003). A presença de DHA parece facilitar a entrada de glicose no cérebro tanto por via passiva, quanto por meio de receptores expressos pela barreira hematoencefálica (BHE) (PATRICK, 2019). Esse processo de entrada facilitada da glicose auxilia na fosforilação das proteínas Tau e impede que estas formem emaranhados, um dos mecanismos responsáveis pela patogenia da doença de Alzheimer (PATRICK, 2019). A presença de DHA também leva a homeostase da BHE, impedindo que haja morte celular por apoptose (AKBAR *et al.*, 2005). Ainda em relação à BHE, sabe-se que esta é formada por ligações intercelulares do tipo *tight junctions*, que, na presença de DHA, são protegidas contra a produção defeituosa das ocludinas frente a presença de proteínas APOE4 produzidas pelos astrócitos (NISHITSUJI *et al.*, 2011).

### 1.7.2 Papel do ômega-3 em doenças parasitárias/infecciosas

Visto que as moléculas de ômega-3 possuem importante papel na resposta imunológica, é importante averiguar a sua importância frente a doenças infecciosas e parasitárias que trazem tantos prejuízos para a sociedade.

Em 2019, Braz de Melo e colaboradores avaliaram o efeito anti-inflamatório do DHA frente a infecções pelo Zika vírus em células *in vitro*, e observou que o tratamento com DHA impediu que houvesse destruição de células do sistema nervoso (BRAZ-DE-MELO *et al.*, 2019). Além disso, moléculas de ômega-3 atuam sobre a microbiota intestinal. Já foram relatados aumento/diminuição de populações distintas de bactérias de acordo com o tratamento que o paciente utilizou, se foi utilizado a suplementação por meio de cápsulas ou por meio da ingestão de alimentos ricos em ômega-3 (COSTANTINI *et al.*, 2017). A modulação da microbiota pelo ômega-3 e os estímulos ao SI leva a melhora de quadros graves de doença celíaca e doença de Crohn (COSTANTINI *et al.*, 2017).

Em relação às doenças parasitárias, em infecções por *Trypanosoma sp.*, há divergências sobre o efeito antiparasitário que o óleo de peixe possui frente a espécies deste gênero (GODFREY, 1958). Silva e colaboradores em 2017 observaram que pacientes chagásicos crônicos que receberam suplementação com cápsulas de óleo de peixe apresentaram um aumento nos níveis de IL-10 em relação aos pacientes que receberam placebo, além de apresentarem níveis reduzidos de triglicerídeos (SILVA *et al.*, 2017). Ainda em relação aos níveis de IL-10, estes foram reduzidos em um estudo conduzidos *in vitro* em esplenócitos de camundongos tratados com óleo de peixe e infectados por *T. cruzi* (LOVO-MARTINS *et al.*, 2017). Ainda foi possível observar redução dos níveis de prostaglandina E2 e de NO plasmático e tecidual (LOVO-MARTINS *et al.*, 2017).

Estudos conduzidos para avaliar o efeito do óleo de peixe em espécies de *Plasmodium* têm sido realizados há algumas décadas, entretanto, apesar disto, poucas informações existem acerca das formas graves da doença. Em 1989, Levander e colaboradores realizaram tratamento utilizando óleo de peixe em camundongos infectados por *P. yoelli* e *P. berghei* e observou aumento na

sobrevivência dos animais e redução dos níveis de parasitemia, tanto nos animais infectados com *P. yoelli* quanto nos infectados com *P. berghei* (LEVANDER, O *et al.*, 1989; LEVANDER, O. A. *et al.*, 1989). Block e colaboradores em 1992 realizou tratamento de camundongos C57Bl/6J, infectados com *P. berghei* K173, com diferentes tipos de óleos, dentre eles, óleo de peixe concentrado (34% EPA e DHA) e observou que estes animais apresentaram aumento na sobrevivência e resistência ao desenvolvimento da MC em relação aos grupos tratados com os demais óleos vegetais. Neste estudo, diferente do observado em outros, não foi observado a redução da carga parasitária após o tratamento com óleo de peixe (BLOK *et al.*, 1992). A ação antiparasitária do óleo de peixe e das moléculas de ômega-3 é um dos parâmetros mais estudados e, mesmo assim, controversos, durante a infecção malárica. Em animais experimentais, além dos já citados anteriormente, outros pesquisadores também fizeram relatos de redução na carga parasitária (FEVANG; SAAV; HOSTMARK, 1995; FUJIKAWA *et al.*, 1993). Ensaio *in vitro* demonstraram que há uma redução do crescimento dos parasitos quando adicionados EPA e DHA no cultivo celular, afetando principalmente os esquizontes (KRUGLIAK *et al.*, 1995; KUMARATILAKE *et al.*, 1992; OMMI *et al.*, 2022).

Em relação aos efeitos anti-inflamatórios que o ômega-3 possui, estes ainda não foram estudados nos quadros de malária grave. Sabendo que esta é uma doença sistêmica e que envolve mecanismos inerentes ao parasito e ao hospedeiro, além das diversas atividades exercidas pelo DHA no cérebro e suas potencialidades para prevenção de danos, torna-se interessante avaliar como esta importante molécula auxilia no processo de prevenção do desenvolvimento da MC, visto que esta consiste na ocorrência de alguns mecanismos semelhantes ao observado durante outras patogenias (contando com ativação de processos pró-inflamatórios e processos mecânicos de obstrução, além de hemorragias teciduais ocasionadas pelo rompimento BHE).

## 2. JUSTIFICATIVA

Ainda que os números relacionados a morte por malária no mundo tenham diminuído no decorrer das últimas décadas, medidas que visam prevenir a doença, que buscam auxiliar o tratamento, e/ou prevenir o desenvolvimento dos quadros graves são de grande importância, principalmente quando relacionados ao desenvolvimento de MC, quadro que leva a óbito milhares de crianças e mulheres grávidas todos os anos.

Apesar de possuir uma alta taxa de mortalidade, pacientes que se recuperam do quadro de MC ainda podem desenvolver sequelas graves, que podem persistir pela vida inteira do paciente. Os atuais tratamentos antimaláricos utilizados em pacientes com MC têm potencial de reverter o quadro clínico. Entretanto, estes não atuam diretamente com o objetivo de reduzir a resposta inflamatória, o que poderia evitar maiores danos cerebrais e, conseqüentemente, a ocorrência de sequelas. Deste modo, medidas que possam auxiliar no tratamento dos pacientes com MC, diminuindo a quantidade de óbitos e de pacientes com sequelas, ou ainda medidas que possam contribuir para impedir que o quadro de MC seja desenvolvido pelos pacientes são necessárias. Atualmente, ainda nenhum tratamento adjuvante para a malária cerebral é recomendado pela Organização Mundial da Saúde, mas diversos estudos já se mostraram eficazes na redução da inflamação tecidual e, conseqüentemente, na mortalidade e gravidade da MC em animais experimentais.

Para o desenvolvimento de estudos relacionados a MC, o uso de animais como modelo experimental tem grande importância, visto que o estudo em humanos é restrito apenas a análises *post-mortem* ou por meio de técnicas caras e pouco específicas, muitas vezes não disponíveis em locais de alta endemicidade para a doença. Atualmente, o modelo experimental mais comumente utilizado para estudo da MC são infecções por *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos das linhagens CBA ou C57BL/6. Estes, apesar de apresentarem algumas diferenças para o quadro clínico observado em humanos, apresentam muitas semelhanças em relação ao desenvolvimento da MC como a inflamação tecidual local, adesão de eritrócitos infectados ao endotélio, ativação de células do endotélio, déficits cognitivos e motores,

rápido desenvolvimento do quadro clínico com baixas taxas de parasitemia sanguínea, entre outros fatores.

Este estudo se mostra importante e necessário, uma vez que a busca por tratamentos adjuvantes que visam auxiliar no combate às altas taxas de mortalidade e a evitar o desenvolvimento de quadros graves é de suma importância para que cada vez mais as taxas de mortalidade relacionadas aos agravamentos causados durante a malária diminuam.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do óleo de peixe rico em DHA no desenvolvimento de malária cerebral em camundongos C57BL/6 infectados por *Plasmodium berghei* ANKA.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar o desenvolvimento clínico da MC nos animais após tratamento com óleo de peixe rico em DHA;
2. Delinear a curva de parasitemia e sobrevivência dos animais tratados
3. Investigar a ocorrência de danos hepáticos, renais e danos causados à barreira hematoencefálica dos animais;
4. Verificar a ocorrência de alterações histopatológicas no cérebro dos animais;
5. Investigar os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias no cérebro e soro dos animais tratados;
6. Investigar os níveis séricos e teciduais de óxido nítrico dos animais tratados;
7. Investigar o perfil de populações celulares presentes no baço dos animais tratados;
8. Investigar a ocorrência de morte neuronal em animais tratados ou não com ômega 3.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Durante a realização deste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, com idade de 6 a 8 semanas, obtidos do Centro de Biologia da Reprodução pertencente a Universidade Federal de Juiz de Fora. Este estudo somente foi realizado após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da mesma universidade (certificado número 019/2020) (Anexo I). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em grupos contendo 5 animais por gaiola, com água filtrada e ração (Nuvital Nutrients) *ad libitum*. As gaiolas foram acondicionadas em estantes ventiladas com regulação da temperatura e incidência de luz (12h claro / 12h escuro).

### 4.2 Desenho experimental

#### 4.2.1 Grupos experimentais

Este estudo contou com a utilização de 5 grupos experimentais, como descrito a seguir:

1. **Controle:** animais tratados com água e sem infecção.
2. **PbA:** animais tratados com água, e infectados com *P. berghei* ANKA.
3. **1,5 g/kg:** animais que receberam tratamento com 1,5 g/kg de ômega-3 e infectados com PbA.
4. **3,0 g/kg:** animais que receberam tratamento com 3,0 g/kg de ômega-3 e infectados com PbA.
5. **6,0 g/kg:** animais que receberam tratamento com 6,0 g/kg de ômega-3 e infectados com PbA.

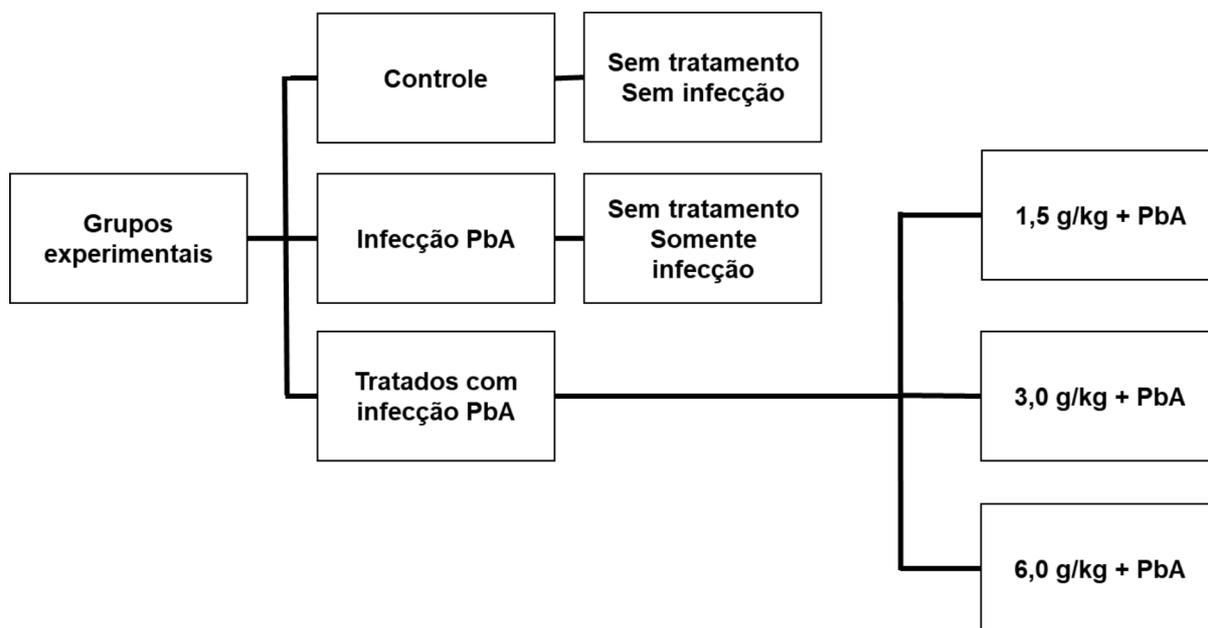


Figura 6: **Fluxograma grupos experimentais**. Os animais foram divididos em 5 grupos - **Controle**: animais sem infecção com PbA e sem tratamento; **PbA**: animais somente infectados com PbA e sem tratamento (n=6); **Tratados: 1,5 g/kg PbA**: animais que receberam 1,5 g/kg de DHA no óleo de peixe durante 15 dias e foram infectados por PbA (n=10); **3,0 g/kg PbA**: animais que receberam 3,0 g/kg de DHA no óleo de peixe durante 15 dias e foram infectados por PbA (n=17); **6,0 g/kg PbA**: animais que receberam 6,0 g/kg de DHA no óleo de peixe durante 15 dias e foram infectados por PbA (n=11).

#### 4.2.2 Tratamento com óleo de peixe DHA

O tratamento dos animais foi realizado com cápsulas de óleo de peixe rico em DHA (DHA 1000 mg – *High Concentration of DHA OMEGA-3, Essential Nutrition*). A composição nutricional das cápsulas de óleo de peixe está descrita na tabela abaixo (Tabela 1). Foram testadas 3 concentrações de DHA presente nas cápsulas de óleo de peixe: 1,5 g/kg, 3,0 g/kg e 6,0 g/kg. Para a realização do tratamento, o óleo de peixe contido nas cápsulas gelatinosas foi aspirado com uma seringa e armazenado em um tubo cônico para então ter sua concentração ajustada de acordo com o grupo experimental a ser tratado. Cada animal recebeu o volume total de 200 µL/dia, por meio de gavagem, do óleo de peixe durante 15 dias e o tratamento continuou até o vigésimo dia após a infecção experimental com PbA (completando 35 dias de tratamento) (Figura 7).

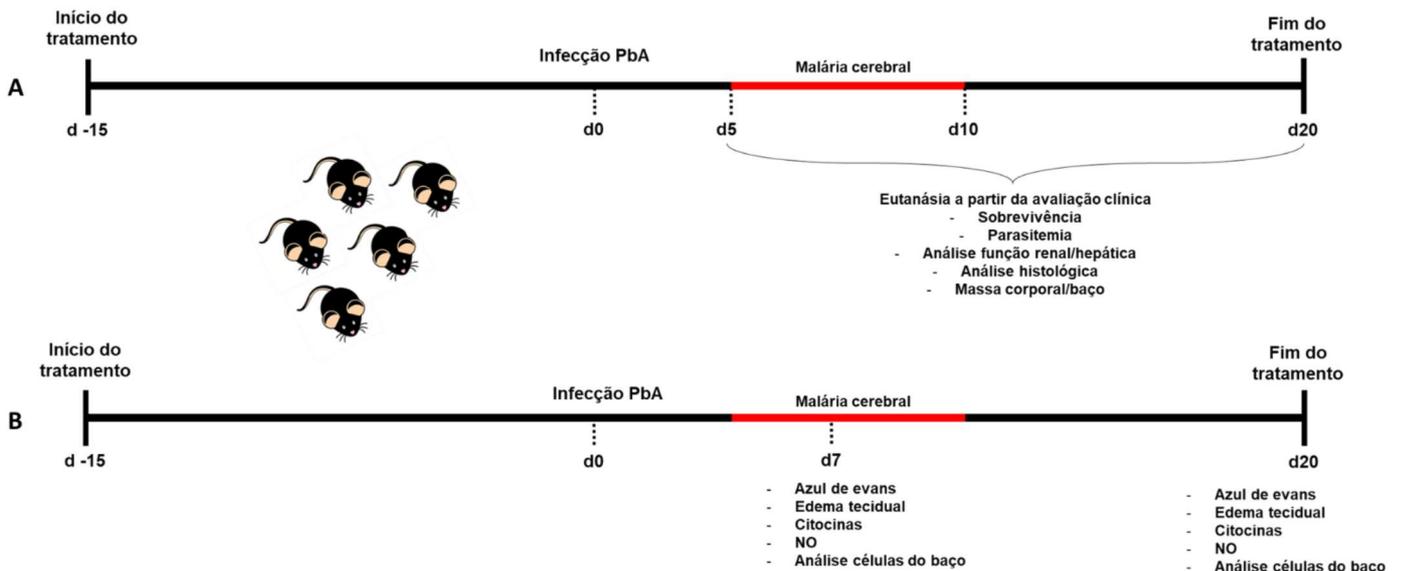


Figura 7: Delineamentos experimentais: em ambos os desenhos experimentais os animais foram tratados durante 15 dias com ômega-3, por via oral, e então infectados por  $10^5$  hemácias parasitadas por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). (A) Após 4 dias da infecção, os animais foram acompanhados diariamente para quantificação da parasitemia sanguínea, realização da avaliação clínica dos animais e acompanhamento da sobrevivência dos mesmos. O tratamento com ômega-3 foi contínuo, mesmo após a infecção por PbA, até o 20 dpi. (B) Os animais foram eutanasiados para coleta de dados em dois momentos diferentes: no 7 dpi e 20 dpi.

Tabela 1: Informação Nutricional das cápsulas de óleo de peixe, adaptada de acordo com o fabricante (Essential Nutrition)

<b>Porções por embalagem: 30</b>		
<b>Porção: 4 g (3 cápsulas)</b>		<b>%V.D.*</b>
<b>Valor energético</b>	27 kcal	1%
<b>Gorduras totais</b>	3,0 g	6%
<b>Gorduras saturadas</b>	0 g	0%
<b>Gorduras trans</b>	0 g	**
<b>Gorduras monoinsaturadas</b>	0,3 g	**
<b>Gorduras poli-insaturadas dos quais:</b>	1,8 g	**
• <b>Ácido eicosapentaenoico (EPA)</b>	0,3 g	**
• <b>Ácido docosahexaenoico (DHA)</b>	1,5 g	**
<b>Colesterol</b>	0 g	**
<b>Vitamina E</b>	9,0 mg	90%
<b>Não contém quantidades significativas de carboidratos, proteínas, fibra alimentar e sódio</b>		

**\*% Valores diários de referência com base em uma dieta de 2000 kcal. Seus valores diários podem ser maiores ou menores, dependendo das suas necessidades energéticas. \*\*Valores diários não estabelecidos**

Composição: óleo de peixe (ômega-3), cápsula (gelatina, água purificada e umectante glicerina), e acetato de tocoferol. Não contém glúten. Alérgicos: contém derivados de peixe.

As concentrações utilizadas no tratamento foram relativas à quantidade de DHA presente no óleo de peixe. Assim, utilizamos 1,5 g/kg, 3,0 g/kg e 6,0 g/kg de DHA contido nas cápsulas de óleo de peixe. Cada cápsula contém 1 mL de óleo de peixe e a concentração de DHA é de 0,5 g/mL em cada cápsula.

#### **4.2.3 Infecção experimental com *Plasmodium berghei* ANKA**

A espécie de plasmódio utilizada neste estudo foi *Plasmodium berghei*, cepa ANKA (PbA). Este é um dos únicos modelos capazes de levar ao desenvolvimento do quadro grave de MC em camundongos C57BL/6 (SOUZA *et al.*, 2010). Os parasitos utilizados estiveram criopreservados em nitrogênio líquido. Portanto, para sua utilização, os criotubos contendo hemácias infectadas por PbA

foram descongelados a temperatura ambiente e 200 µL do sangue congelado foram inoculados em cada camundongo, chamados de camundongos repique. Entre 4 e 6 dias decorridos da infecção, foram realizados esfregaços sanguíneos dos camundongos repiques para contagem da sua parasitemia. Assim, quando estes animais apresentaram parasitemia sanguínea em torno de 4 a 8%, estes foram anestesiados com uma solução anestésica (NaCl 0,9%, 2% Xilazina e 10% Quetamina) via intraperitoneal, e o sangue foi coletado por punção cardíaca, utilizando seringa contendo heparina. Após a coleta do sangue, foi realizado o deslocamento de cervical dos animais.

O sangue coletado foi adicionado em tampão fosfato salino (PBS – 1,3 M NaCl, 0,081 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,014 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,027 M KCl) e centrifugado a 300 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as hemácias foi ressuspenso em 10 mL de PBS 1x e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento medido e ressuspenso 1 mL de PBS 1x. A seguir, as hemácias foram quantificadas em câmara de Neubauer e, a partir da parasitemia apresentada pelo camundongo repique, a concentração de hemácias parasitadas foi ajustada para 10<sup>5</sup> hemácias parasitadas para cada animal a ser desafiado pertencente aos grupos experimentais. A infecção dos animais foi realizada com 200 µL, via intraperitoneal.

#### **4.3 Avaliação clínica diária, acompanhamento da parasitemia sanguínea e determinação da curva de sobrevivência.**

Quatro dias após a realização da infecção experimental com PbA, quando os parasitos sanguíneos começaram a ser detectados no sangue circulante, os animais começaram a ser avaliados clinicamente. Esta avaliação clínica permitiu observar se os animais apresentavam algum déficit neurológico ou comportamental que indicasse o agravamento do quadro clínico.

Padronizado por Carroll e colaboradores (CARROLL *et al.*, 2010), a escala rápida de coma e comportamento murino (RMCBS – *rapid murine coma and behaviour scale*) é baseada na observação dos parâmetros comportamentais e neurológicos de

forma periódica, permitindo determinar o momento do coma dos animais e, conseqüentemente, o momento para realização da eutanásia. Durante a aplicação do RMCBS, dez parâmetros são avaliados e pontuados de 0 a 2, onde 0 indica a disfuncionalidade do parâmetro e 2 a sua normalidade. De acordo com a pontuação apresentada, os animais foram avaliados em determinados intervalos de tempo: 20 pontos: 24h; 19 a 16 pontos: 12h; 15 a 11 pontos: 4 horas; 10 a 6 pontos: 2 horas. Uma vez que os animais apresentam pontuação menor ou igual a 5 é realizada a eutanásia. Os parâmetros avaliados são referentes a coordenação (marcha e equilíbrio), comportamento exploratório (capacidade de percorrer a gaiola), força e tônus (posição do corpo e força dos membros), reflexos e autopreservação (fuga ao toque, reflexo do pavilhão auricular, reflexo plantar, agressão) e comportamento de higiene (*grooming*). A tabela utilizada para avaliação segue em anexo a este documento (Anexo II).

Seguindo-se a avaliação clínica diária dos animais, foi realizada a coleta do sangue para determinação da parasitemia sanguínea. Para tal, uma gota de sangue da veia caudal dos animais foi coletada e estendida em uma lâmina de vidro para confecção dos esfregaços sanguíneos. As lâminas foram fixadas com metanol por 3 minutos e coradas com Giemsa a 10% por 20 minutos. As células foram contadas posteriormente em microscópio ótico (Olympus CX41) em lente de aumento de 100x. Para determinação da parasitemia, foram contadas a quantidade de hemácias parasitadas em um universo de mil hemácias.

#### **4.4 Eutanásia**

Uma vez que os animais apresentaram pontuação igual ou menor que 5 na avaliação clínica, foi iniciado o processo de eutanásia. Para tal, os camundongos foram anestesiados com solução anestésica (NaCl 0,9%, 2% Xilazina e 10% Quetamina) e então foi realizada punção cardíaca para coleta do sangue. O sangue foi armazenado em tubos cônicos para posterior obtenção do soro. Após a coleta do sangue, foi realizada a perfusão cardíaca, utilizando 40 mL de PBS 1X. A perfusão é um processo importante especialmente para a avaliação histopatológica do órgão de

interesse, pois, permite que células (sanguíneas ou não) não aderidas ao endotélio sejam retiradas do vaso. Em seguida, foi realizada a coleta do baço e cérebro dos animais. Antes de ser removido, foi fotografada a calota craniana dos animais onde pode-se observar a ocorrência de macro hemorragias ocasionadas durante o quadro de MC. O cérebro foi então coletado e clivado; parte deste órgão foi acondicionado em formalina (formol a 10% em PBS) para a fixação tecidual para posterior análise histopatológica e outra parte armazenada em soro fetal bovino (Gibco) para armazenamento a -80 °C para obtenção de citocinas *in situ*.

#### **4.5 Dosagens bioquímicas e de óxido nítrico**

Análises bioquímicas foram utilizadas para dosagem de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina e ureia. Os testes foram realizados de acordo com o recomendado pelo fabricante (Labtest diagnostics). A dosagem de óxido nítrico foi realizada no soro e no homogenato de cérebro obtidos dos animais dos grupos experimentais. 50 µL de soro ou de homogenato foram plaqueados em placas de 96 poços e a mesma quantidade foi adicionada de reagente de Greiss (Sigma) diluído de acordo com o fabricante. Após 15 minutos a absorbância foi lida a 540 nm. A concentração de NO presente nas amostras foi calculada com base em uma curva padrão contendo nitrito.

#### **4.6 Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica**

A técnica de Azul de Evans tem como objetivo demonstrar a presença de danos na barreira hematoencefálica, causada pelo aumento da permeabilidade vascular durante o quadro de MC (THUMWOOD *et al.*, 1988). Assim, uma vez que os animais apresentam pontuação menor e igual a cinco na avaliação clínica, estes foram anestesiados com solução anestésica, e a seguir foi injetada, via veia caudal, 200 µL de solução de azul de Evans a 2% (Sigma-Aldrich). Após 1h, os animais foram, então, eutanasiados com uso de solução anestésica e realizada perfusão sanguínea com 10 mL de solução salina. A calota craniana foi fotografada, bem como o cérebro. Após

retirada da calota craniana o cérebro foi pesado e adicionado à 2 mL de formamida por 48h, a 37°C, (Sigma-Aldrich) para determinação da concentração de corante extravasado para o tecido. Essa dosagem foi realizada em espectrofotômetro obtendo-se valores de absorvância com passagem em filtro de 620 nm. Então, a absorvância obtida foi normalizada de acordo com o peso do cérebro de cada animal.

#### **4.7 Avaliação de edema tecidual**

Para avaliar a ocorrência ou não de edema tecidual no cérebro dos animais após infecção por *P. berghei* ANKA, foi realizada a eutanásia dos animais e a coleta do cérebro. Após coletado, o tecido foi pesado e armazenados em microtubos cônicos e mantidos a 60°C durante 48h (PROMENEUR *et al.*, 2013). Logo, para cálculo da quantidade de água presente no tecido, foi realizada a subtração do valor inicial para o valor final do tecido após dessecação.

#### **4.8 Processamento tecidual para inclusão em parafina e microscopia eletrônica de varredura**

Após coleta do cérebro dos animais, os mesmos foram imediatamente processados, sendo primeiramente fixados em solução tampão contendo 4% de paraformaldeído (Synth). Após a fixação, procedeu-se o processo de desidratação, para tal, a solução de fixação foi descartada e adicionou-se etanol 70%. Novamente, após permanecer 24h em etanol a 70%, o tecido foi imerso por 30 minutos em concentrações crescentes de etanol (80%, 95%, 100%, 100%). Após a desidratação, realizou-se a diafanização do tecido, por meio de imersão em Xilol P.A. (Synth) durante 20 minutos, por 3 vezes. Logo foi realizada a imersão do tecido em parafina durante 30 minutos para posterior inclusão e formação dos blocos. Cortes de 5 µm foram realizados no micrótomo (Leica) e os cortes adicionados a lâminas de vidro onde foram devidamente identificadas. Seguiu-se a coloração tecidual com hematoxilina-eosina e azul de toluidina. Para coloração tecidual, as lâminas foram submetidas ao processo de desparafinação por submersão em xilol PA e depois em

concentrações decrescentes de álcool etílico para reidratação do tecido. Então as lâminas foram imersas em hematoxilina e em seguida em eosina ou em azul de toluidina. Ao final das baterias de imersão, adicionaram-se lamínulas de vidro para montagem final da lâmina.

Para confecção das lâminas analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), o tecido foi cortado em secções de 5 µm e desparafinado, desidratado e foi deixado para secagem a temperatura ambiente. Depois foram adicionados a *stubs* de alumínio e então os cortes receberam uma fina camada de ouro para análise.

## **4.9 Dosagem de citocinas extraídas do tecido cerebral e soro**

### **4.9.1 Obtenção de homogenato tecidual para dosagem de citocinas**

Durante a eutanásia, parte dos cérebros dos animais foi armazenado em soro fetal bovino a -80°C para que fosse possível a extração e dosagem de citocinas presentes no tecido. Deste modo, para realização do processo de extração de citocinas teciduais foi necessário pesar o tecido e macerá-lo com solução para extração de citocinas (0,4 M NaCl, 0,05% Tween-20, 0,5% albumina de soro bovino, 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA, 0,02% de aprotinina – para cada 100 mg de tecido foi acrescido 1000 µL de solução de extração de citocinas) para obtenção do homogenato tecidual. Após o processo de macerar o tecido, a suspensão obtida foi centrifugada a 2000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e aliquotado em microtubos e armazenados a -80 °C até o momento da realização do ensaio imuno-enzimático para detecção das citocinas ali presentes.

### **4.9.2 Dosagem de citocinas presentes no soro por citometria de fluxo**

A realização da dosagem de citocinas no soro dos animais foi feita a partir da metodologia de *Cytometric Bead Array* (CBA – Ensaio de citometria por microesferas) (BD Biosciences).

O ensaio por CBA utilizado é capaz de dosar 7 citocinas, por meio de microesferas de captura, em amostras biológicas; as citocinas dosadas foram IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-17A. Para a realização do ensaio, realizado de acordo com as instruções do fabricante, foi feita uma solução contendo os 7 tipos de microesferas marcadas referentes a cada citocina a ser analisada.

A curva padrão utilizada no teste foi diluída em 2 mL de solução diluente e foi realizada uma diluição seriada em que a maior concentração foi 5000 pg/mL e a menor 0 pg/mL. Foram adicionados a microtubos 25  $\mu$ L do mix de microesferas, 25  $\mu$ L das amostras, ou da curva padrão, e 25  $\mu$ L dos anticorpos de detecção e incubados por 2h, a temperatura ambiente, no escuro. Após a incubação, foram adicionados 500  $\mu$ L solução de lavagem em cada tubo e estes foram centrifugados a 200 g, por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e as microesferas ressuspensas em 200  $\mu$ L de solução de lavagem para realizar a aquisição no citômetro de fluxo.

As configurações para aquisição foram feitas de acordo com as instruções do fabricante, e a aquisição foi feita, inicialmente, a partir do ponto onde não houve adição de curva padrão. A partir desse ponto, foi feita a leitura da curva padrão de modo que as concentrações fossem da menos concentrada para a mais concentrada. Na figura 8 segue a configuração utilizada para a leitura das amostras. Cada pico de fluorescência no histograma é representativo de uma citocina a ser analisada. As concentrações de citocinas foram determinadas com base na média de fluorescência apresentada em cada pico para cada citocina analisada. A leitura das amostras foi realizada no citômetro Canto II (BD) e as análises foram realizadas utilizando o software FlowJo.

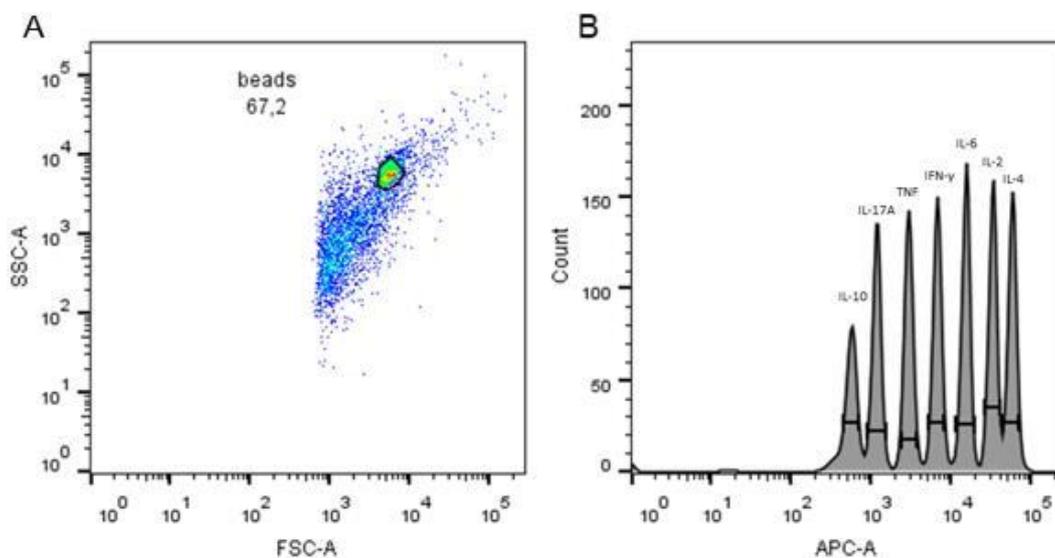


Figura 8: Configurações utilizadas durante a leitura das microesferas no ensaio de CBA para detecção de citocinas em homogenato de cérebro. Em **A** podemos observar a localização das microesferas de acordo com o seu tamanho e granulidade enquanto o gráfico **B** demonstra os picos que representam a presença de cada citocina na amostra, de acordo com sua fluorescência.

#### 4.10 Marcação para fenotipagem celular no baço e cérebro dos animais dos grupos experimentais

A determinação das populações de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, macrófagos e neutrófilos presentes no baço dos animais tratados ou não com ômega-3 foi realizada por meio de marcação por anticorpos monoclonais anti-TCR (PE, BD Pharmingen), anti-CD4 (APC-H7, BD Pharmingen), anti-CD8 (AF700, BD Pharmingen), anti-CD11b (PerCP-Cy5.5, BD Pharmingen), anti-Ly6G (SB600, eBioscience), anti-Ly6C (APC-Cy7, BD Pharmingen). Para tal, foi realizada a maceração tecidual em redes com poros de 70 μm (*Cell strainer* – Gibco) e 10 mL de PBS com soro fetal bovino, a 5%. Após macerados, o tecido foi centrifugado a 500 g por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento contendo as células foi ressuspenso com 5 mL de solução ACK (0,15 M de cloreto de amônio, 0,01 M de bicarbonato de potássio, 0,012 mM de EDTA, qsp. 1L) para a lise dos eritrócitos. Após 4 minutos, a suspensão foi acrescida de 10 mL de meio RPMI com 5% de soro fetal bovino. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento ressuspenso para 1 mL para a contagem das células. As células foram então plaqueadas na concentração de 5x10<sup>6</sup> células/mL, em

placas de fundo V, e centrifugadas a 500 g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com 50 µL de um marcador de viabilidade celular (*Live/Dead Cell Marker*, BV421, Invitrogen) e incubado por 30 minutos, no escuro a 4°C. Em sequência, foi adicionado à placa 100 µL/poço de tampão FACS (PBS com 5% de soro fetal bovino), e as células foram centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e prosseguiu-se com a marcação com a mistura de anticorpos acima. Foram adicionados 50 µL dessa mistura de anticorpos em cada poço e então foi feita a incubação da placa por 30 minutos, no escuro, a 4°C. Posteriormente foram realizadas duas lavagens da placa com 150 µL de tampão FACS/poço, a placa foi centrifugada a 500 g por 10 minutos a 4°C.

As amostras foram ressuspensas com tampão de citometria e a aquisição das amostras foi realizada no citômetro Cytoflex (Beckman Coulter Life Science). As análises foram realizadas por meio do software FlowJo versão 10.0. A estratégia utilizada para as análises no software está descrita nas imagens a seguir (Figura 9 e 10).

#### **4.12 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism (versão 6.0). Testes de normalidade foram aplicados para avaliar a distribuição das variáveis, e uma vez que a distribuição foi Normal, o teste paramétrico One-Way Anova foi aplicado, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Se a distribuição não foi Normal, foi aplicado o teste *t* de *Student* para comparar as médias entre dois grupos.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

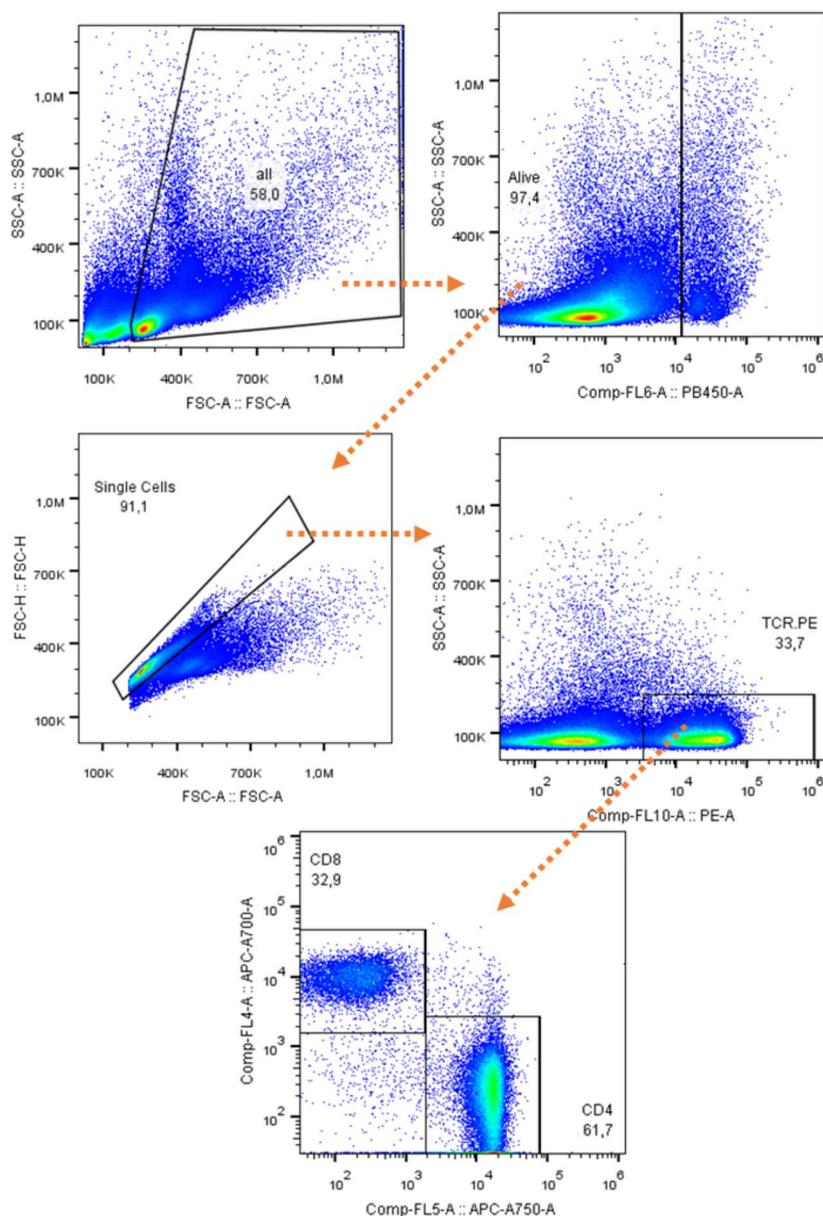


Figura 9: Estratégia de análise para observação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A estratégia utilizada para a análise da população celular presente no baço dos animais. Primeiramente foram selecionados os esplenócitos, em seguida, as células vivas de acordo com a marcação Live/Dead. Dentro desta população, as células expressando TCR<sup>+</sup> foram selecionadas para ser observada a população de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

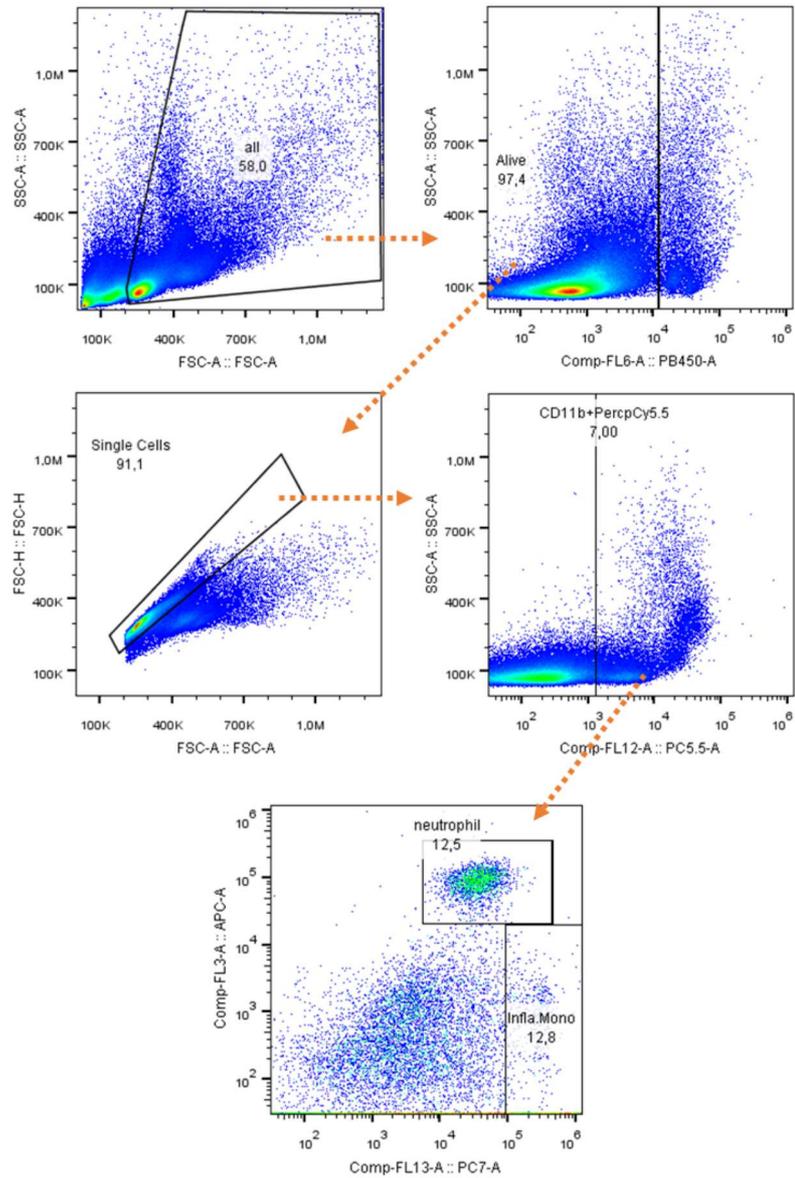


Figura 10: Estratégia utilizada para delimitação das populações de neutrófilos e macrófagos presentes no baço. As células foram marcadas com Live/Dead, uma vez selecionadas, as células vivas, foi possível separar as que expressam marcador CD11b<sup>+</sup> e avaliar o número de neutrófilos e monócitos inflamatórios nas amostras (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> respectivamente).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Tratamento com óleo de peixe rico em DHA prolongou a sobrevivência de camundongos após infecção por *P. berghei* ANKA

Camundongos C57BL/6 foram tratados diariamente com óleo de peixe rico em DHA e, após 15 dias, foram infectados por PbA. Pode-se observar que animais não tratados, mas infectados por PbA, desenvolveram sintomas neurológicos como inatividade, ataxia, tremor e perda de função motora. Todos os animais não tratados com óleo de peixe rico em DHA morreram entre o 6º e o 8º dia após a infecção enquanto os animais tratados apresentaram taxas de sobrevivência de 22%, 60% e 81% em relação as doses de 1,5, 3,0 e 6,0 g/kg de DHA, respectivamente. Os animais que sobreviveram ao período crítico para malária cerebral não apresentaram sintomas neurológicos, sugerindo que o efeito protetivo do DHA seria dose-dependente (Figura 11 A-C).

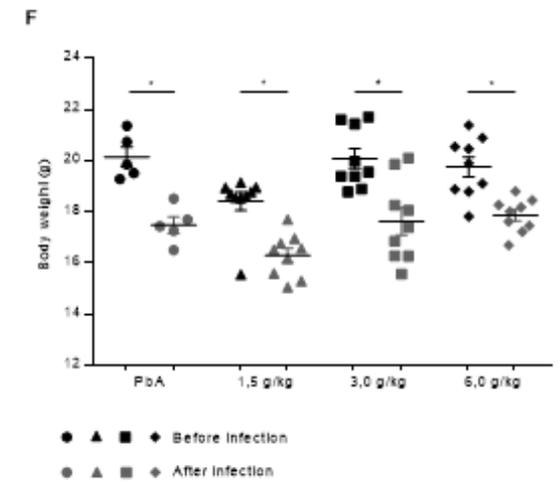
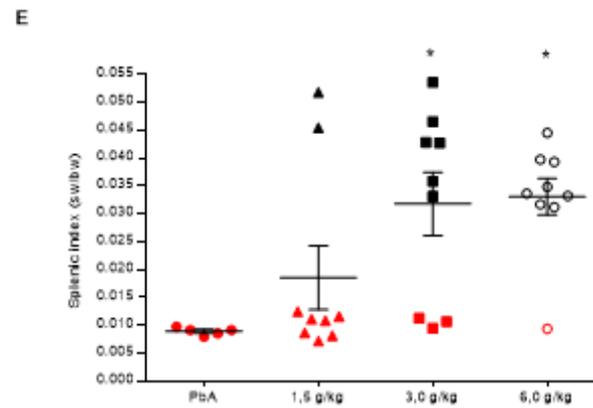
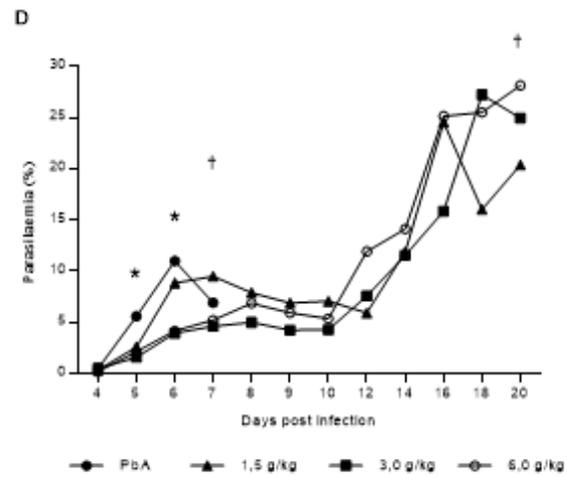
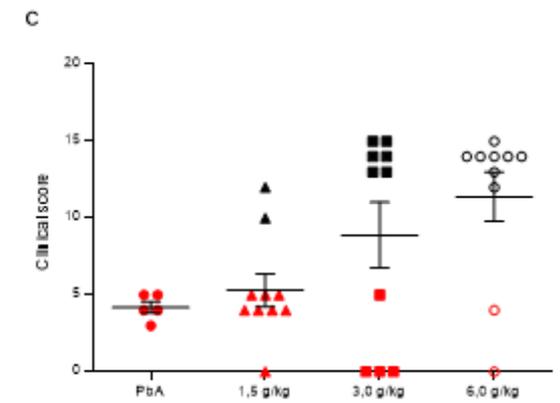
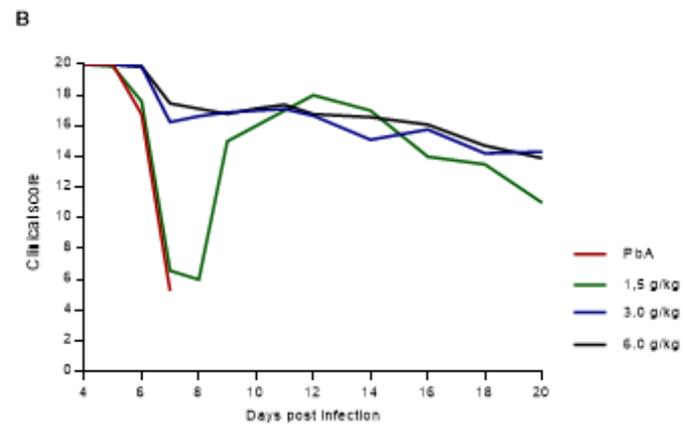
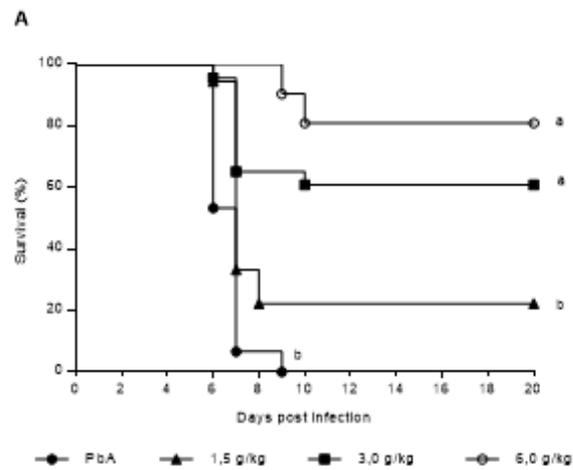


Figura 11: Avaliação das condições clínicas de camundongos infectados por PbA tratados ou não com óleo de peixe rico em DHA.

(A) curva de sobrevivência de animais tratados e não tratados. (B) avaliação clínica do RMCBS durante a infecção e (C) no momento da eutanásia. Os símbolos vermelhos em C indicam que o animal desenvolveu malária cerebral e foi eutanasiado quando a pontuação da avaliação clínica era igual ou menor que 5. (D) Frequência da parasitemia em camundongos infectados. As cruzes nos dias 7 e 20 indicam os dois momentos em que os demais parâmetros foram avaliados. (E) Índice esplênico apresentado pelos camundongos no momento da eutanásia (peso do baço/peso corporal). Os símbolos em vermelho no gráfico E representam animais que foram eutanasiados quando a pontuação da avaliação clínica era menor ou igual a 5. (F) Peso corporal antes e depois da infecção. Os resultados apresentados são representativos de dois ou mais experimentos independentes (n = 9/10 camundongos/grupo). São mostradas as médias  $\pm$  SEM. Diferentes letras em A representam diferença estatística significativa entre os grupos tratados e não tratados ( $p < 0,05$ ). \* representa diferença estatística significativa entre os grupos tratados e não tratados ( $p < 0,05$ ). PbA: Plasmodium berghei ANKA. 1,5 g/kg: animais tratados com 1,5 g/kg de DHA contido no óleo de peixe. 3,0 g/kg: animais tratados com 3,0 g/kg de DHA contido no óleo de peixe. 6,0 g/kg: animais tratados com 6,0 g/kg de DHA contido no óleo de peixe.

## 5.2 Efeito do tratamento com óleo de peixe rico em DHA na parasitemia, peso corporal, função hepática e renal em camundongos infectados por *P. berghei* ANKA

Camundongos não tratados com óleo de peixe, mas infectados por PbA, apresentaram significativo aumento na carga parasitária no 5º e 6º dia após a infecção em relação aos grupos tratados com 3,0 e 6,0 g/kg de DHA. A média da parasitemia apresentada pelo grupo tratado com 1,5 g/kg de DHA não foi significativamente diferente do grupo apenas infectado. Apesar da dose de DHA utilizada, a carga parasitária permaneceu controlada ( $< 10\%$ ) do 7 dia pós infecção até o final do período crítico para malária cerebral. Após esse período, a parasitemia é aumentada progressivamente atingindo picos de até 20% no último dia de avaliação clínica. Não foi observado neste estudo o efeito dose-dependente da parasitemia em relação às diferentes doses utilizadas de DHA (Figura 11 D). Também é importante notar que os animais que desenvolveram altas parasitemias apresentaram um aumento no índice esplênico em relação aos animais que foram eutanasiados devido a malária cerebral (Figura 11 E). No final da avaliação clínica, os animais tratados com óleo de peixe rico em DHA apresentaram perda de peso (Figura 11 F). No 7º dia após a infecção, as concentrações de AST, ALT, creatinina e ureia se mostraram similares ao observado nos animais não tratados e não infectados por PbA, mostrando assim que estes

índices permaneceram semelhantes aos níveis de camundongos saudáveis (Figura 12 A-D).

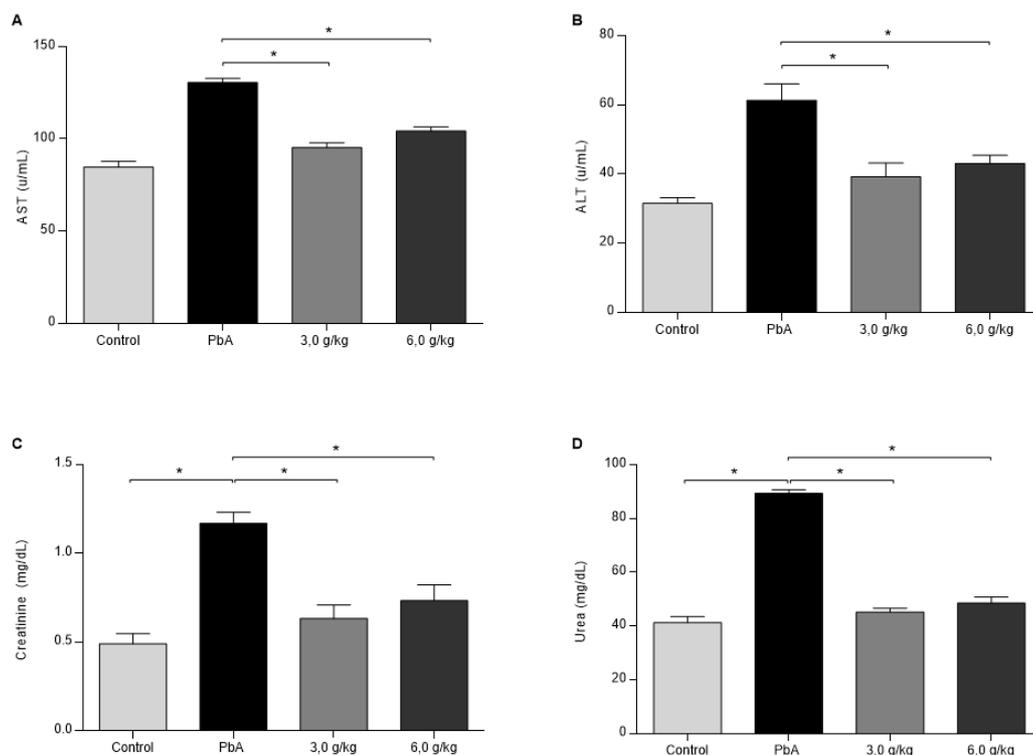


Figura 12: Avaliação da função hepática e renal de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* ANKA tratados com óleo de peixe rico em DHA.

(A) Aspartato aminotransferase dosada no soro dos animais (U/mL); (B) alanina aminotransferase dosada no soro dos animais (U/mL); (C) níveis de creatinina no soro dos grupos experimentais (mg/dL); (D) níveis de ureia no soro. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (n = 5-6 camundongos/grupo), amostras foram coletadas no 7º dpi, e são mostradas as médias  $\pm$  SEM. \* indica diferença estatística significativa entre os grupos com  $p < 0,05$ . Control: grupo não infectado e não tratado; PbA: *Plasmodium berghei* ANKA. 3,0 g/kg: animais tratados com 3,0 g/kg de DHA contido no óleo de peixe. 6,0 g/kg: animais tratados com 6,0 g/kg de DHA contido no óleo de peixe.

### 5.3 O tratamento com óleo de peixe rico em DHA impediu o rompimento da barreira hematoencefálica e outros danos teciduais cerebrais

Para avaliar o rompimento da barreira hematoencefálica nos animais após o tratamento com óleo de peixe rico em DHA, os animais foram submetidos a técnica de azul de Evans. O extravasamento do corante para o tecido indica danos na barreira hematoencefálica. O extravasamento foi maior e os danos foram melhor observados

nos animais que não receberam tratamento com óleo de peixe e foram apenas infectados por PbA (Figura 13 A-D). Além disso, os animais tratados com 3,0 e 6,0 g/kg de DHA apresentaram concentração de azul de Evans no parênquima tecidual 3x menor do que o observado em animais não tratados (Figura 13 E). Durante o quadro de MC, ainda é possível observar a ocorrência de edema tecidual, mas os animais tratados com as maiores doses de DHA não apresentaram a ocorrência de edema (Figura 13 F).

Do mesmo modo, os animais tratados com 3,0 e 6,0 g/kg de DHA não apresentaram regiões de oclusão vascular e preveniram a ocorrência de hemorragias teciduais (Figura 14 A e B). Animais infectados e não tratados apresentaram áreas hemorrágicas e oclusões vasculares, com a presença de hemácias e leucócitos, em vasos sanguíneos no cérebro (Figura 14 C e D). entretanto, nenhuma destas alterações foram observadas nos animais tratados com óleo de peixe rico em DHA (Figura 14 E-L).

A frequência de hemorragias, vasos obstruídos e a presença de leucócitos foi significativamente aumentada em animais não tratados e apenas infectados por PbA em comparação aos animais que receberam tratamento e infecção (Figura 14 M-O). Além disso, uma maior quantidade de eritrócitos nos vasos sanguíneos cerebrais perdera o formato bicôncavo nos animais não tratados e apenas infectados por PbA, ao invés disso, apresentarem o formato côncavo (Figura 15), incluindo os eritrócitos presentes na corrente sanguínea (dados não mostrados). Essas alterações foram menos notadas em eritrócitos de animais tratados com óleo de peixe rico em DHA.

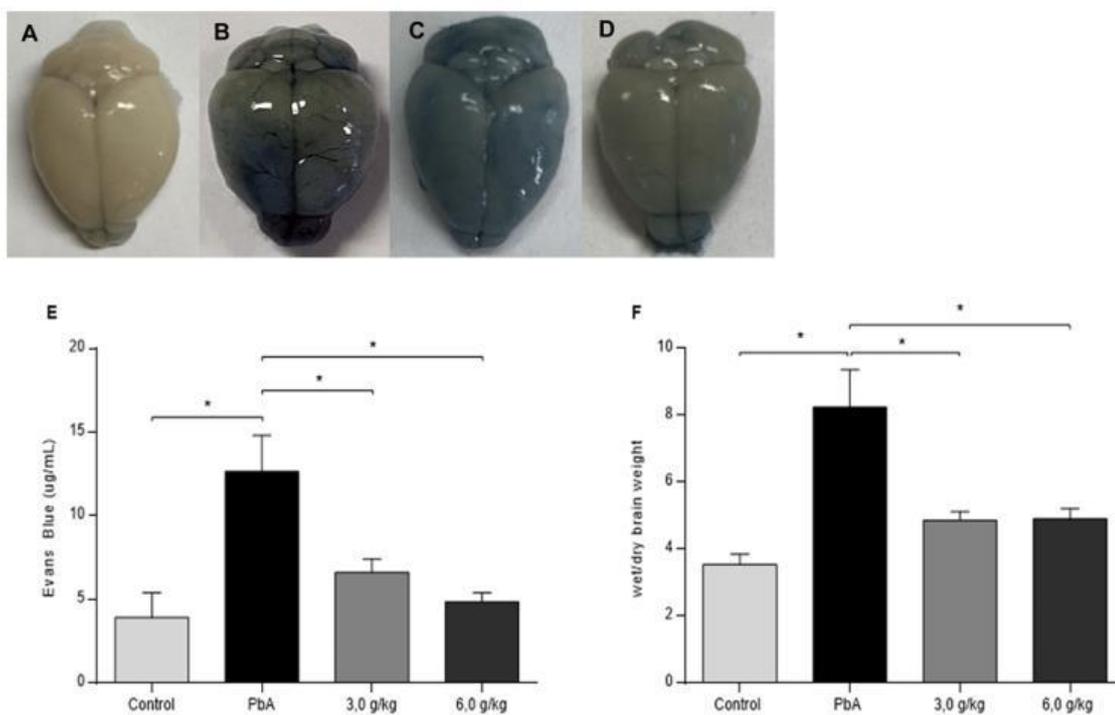


Figura 13: Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica e do desenvolvimento de edema cerebral em camundongos infectados por PbA e tratados com óleo de peixe rico em DHA. Animais foram eutanasiados no 7º dpi e os cérebros coletados e fotografados dos grupos (A) sem tratamento e sem infecção - control; (B) camundongos apenas infectados com PbA, sem tratamento com óleo de peixe rico em DHA; (C) 3,0 g/kg: animais tratados com 3,0 g/kg de DHA contido no óleo de peixe; (D) 6,0 g/kg: animais tratados com 6,0 g/kg de DHA contido no óleo de peixe. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes ( $n = 5-6$  camundongos/grupo), amostras foram coletadas no 7º dpi, e são mostradas as médias  $\pm$  SEM. \* indica diferença estatística significativa entre os grupos com  $p < 0,05$ . PbA: *Plasmodium berghei* ANKA.

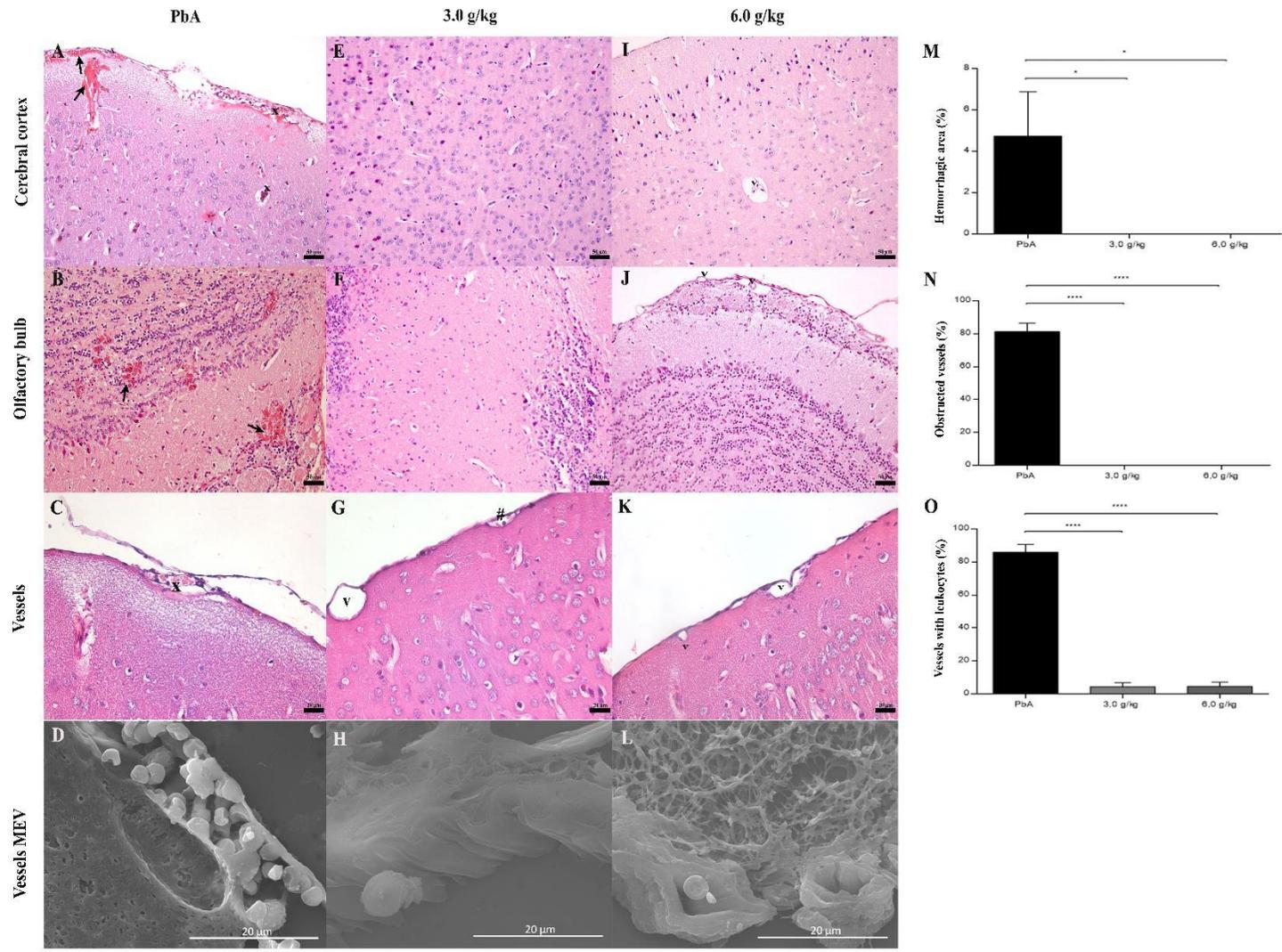


Figura 14: Análise histopatológica dos cérebros dos animais tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectados por PbA. Os cérebros dos animais foram coletados no 7º dpi.

(A-D) animais apenas infectados por PbA, não receberam tratamento com óleo de peixe. Pode-se observar áreas com hemorragias, vasos obstruídos e leucócitos aderidos ao endotélio vascular. (E-H) camundongos tratados com 3,0 g/kg e (I-L) tratados com 6,0 g/kg de DHA não apresentaram regiões hemorrágicas e vasos com obstrução no tecido cerebral, apesar de apresentarem alguns vasos com a presença de leucócitos. (M) áreas hemorrágicas representadas em porcentagem em relação ao total do tecido. Resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM ( $n = 5$  animais/grupo). \*\*\*\*  $p < 0,001$ . (N) percentual de vasos obstruídos. Resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM ( $n = 5$  animais/grupo). \*\*\*\*  $p < 0,001$ . (O) percentual de vasos com a presença de leucócitos. Resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM ( $n = 5$  animais/grupo). \*\*\*\*  $p < 0,001$ . (A, B, E, K, I, J): micrografias com aumento de 20x e barra de escala tamanho 50  $\mu\text{m}$ ; (C, F, G): micrografias aumento 40x, barra de escala em 20  $\mu\text{m}$ ; (D, H, L): microscopia eletrônica de varredura, barra de escala 20  $\mu\text{m}$ . Seta: áreas hemorrágicas; X: vasos obstruídos; V: vasos sem obstrução; PbA: *Plasmodium berghei* ANKA.

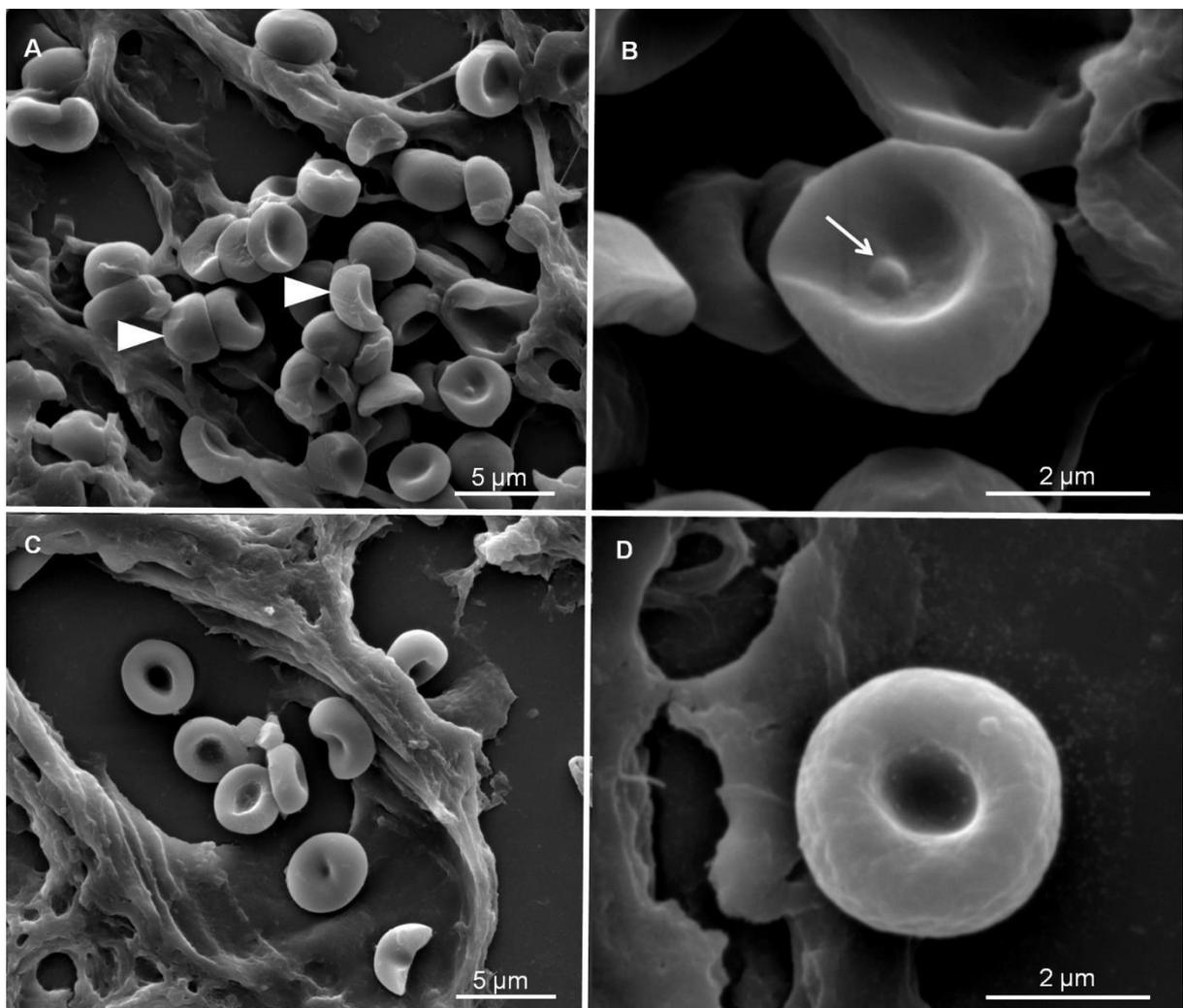


Figura 15: Avaliação da integridade das hemácias de camundongos tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com PbA.

(A e B) microscopia eletrônica de varredura de hemácias de animais que não receberam tratamento com óleo de peixe e foram infectados com PbA – pode-se observar que houve uma perda na conformação bicôncava das células. (C e D) microscopia eletrônica de varredura de hemácias de camundongos tratados com 6,0 g/kg de DHA e infectados por PbA. Cabeça de seta: hemácias com formato côncavo. Seta: PbA.  $n = 3$  camundongos/grupo.

#### **5.4 Efeito do tratamento com óleo de peixe rico em DHA no perfil pró- e anti-inflamatório de citocinas no cérebro de camundongos infectados**

Em relação as citocinas circulantes, no 7º dpi, não foi observado níveis detectáveis de IFN- $\gamma$  nos camundongos tratados com óleo de peixe rico em DHA, entretanto, estes foram detectáveis nos camundongos que não receberam tratamento (Figura 16 A). IFN- $\gamma$  circulante ainda não foi detectável no 20º dpi nos grupos tratados com DHA. Altos níveis de IL-6 foram observados no grupo PbA em comparação aos que receberam tratamento, tanto no 7º quanto no 20º dpi (Figura 16 B). Por outro lado, níveis de TNF- $\alpha$  foram significativamente aumentados nos animais tratados no 7º dpi quando comparados aos animais que não receberam tratamento, apenas a infecção por PbA, apesar de terem apresentado uma redução dos níveis desta citocina no último dia de avaliação do estudo (Figura 16 C). Os níveis de IL-10 foram maiores nos animais tratados com óleo de peixe rico em DHA em ambos os momentos de avaliação em comparação aos animais que não receberam tratamento, apenas a infecção por PbA (Figura 16 D). Estes níveis de IL-10 foram 1,3x e 3,8x maiores no 7º e 20º dpi no grupo tratado com 3,0 g/kg de DHA e 1,8x e 3,0x maiores no 7º e 20º dpi para os animais tratados com 6,0 g/kg de DHA em relação aos animais apenas infectados.

Também buscamos avaliar os níveis de citocinas presentes no cérebro dos animais após a infecção por PbA. No 7º dpi, os níveis de IFN- $\gamma$  se apresentaram significativamente elevados nos animais tratados com óleo de peixe rico em DHA em comparação aos não tratados; entretanto, no 20º dpi estes níveis se apresentaram similares aqueles observados pelo grupo não tratado (PbA) (Figura 16 E). Já em relação aos níveis de TNF- $\alpha$ , estes estiveram reduzidos nos animais tratados com óleo de peixe rico em DHA em comparação aos níveis observados nos animais apenas infectados no 7º dpi. Entretanto, os níveis desta citocina se mostraram aumentados no 20º dpi (Figura 16 F). Os níveis de IL-10 se mostraram 1,5x e 2,8x mais elevados nos animais tratados com as maiores doses de óleo de peixe rico em DHA, respectivamente, em comparação ao grupo PbA no 20º dpi (Figura 16 G). Quando analisamos o balanço de citocinas pró e anti-inflamatória no soro e no homogenato de tecido cerebral em ambos os momentos de análise, foi possível observar um perfil anti-inflamatório no soro dos animais apenas tratados no 20º dia

após a infecção (Figura 17 A). por outro lado, o perfil anti-inflamatório no cérebro foi apenas observado nos animais no 7º dpi (Figura 17 B). Os níveis de citocinas IL-2, IL-4 e IL-17 não foram detectáveis em nenhuma das amostras testadas (dados não mostrados).

Em relação aos níveis de NO detectados na circulação, os animais tratados com 6,0 g/kg de DHA apresentaram no 7º dpi redução dos níveis de NO em relação a todos os grupos (Figura 18 A), enquanto os níveis de NO no cérebro destes animais estiveram significativamente aumentados. Entretanto, por outro lado, no 20º dpi estes níveis foram reduzidos no cérebro dos animais tratados com 6,0 g/kg, se apresentando em níveis semelhantes ao apresentado pelos animais do grupo controle e apenas infectados por PbA (Figura 18 B).

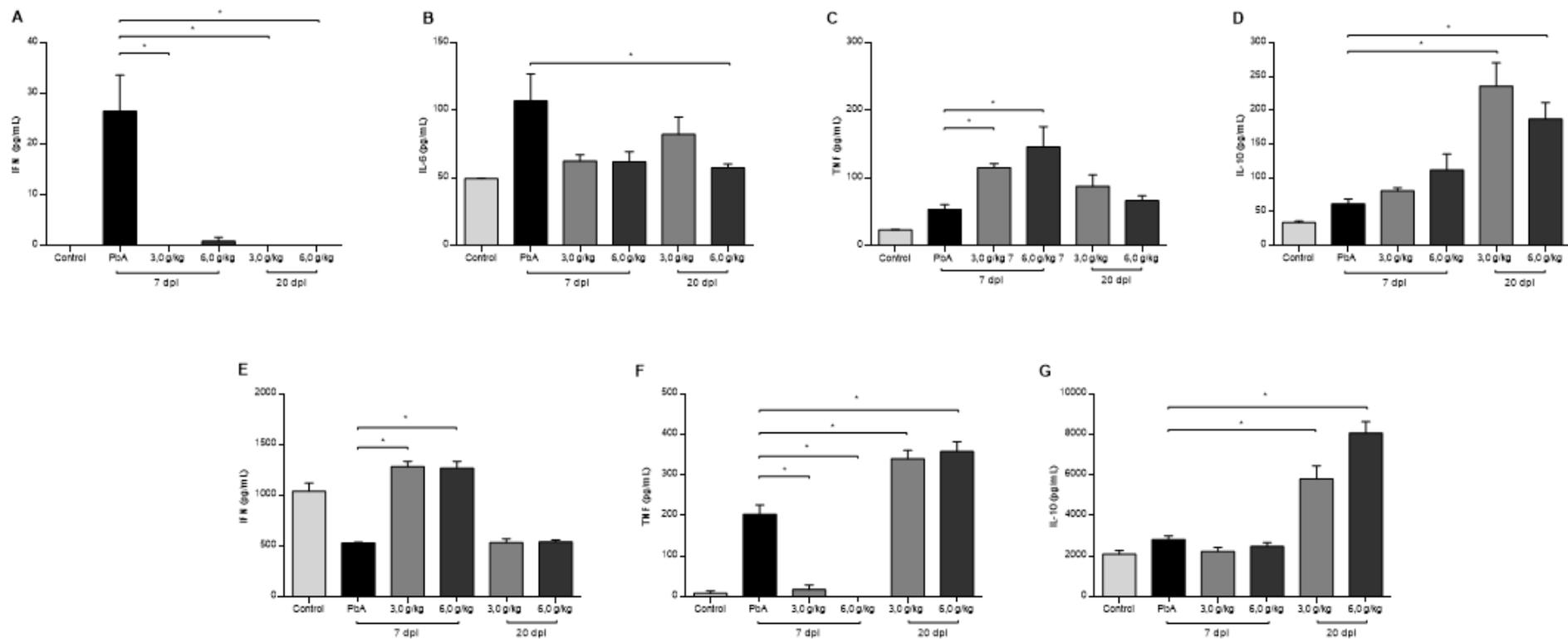


Figura 16: Níveis de citocinas em camundongos infectados por PbA e tratados com óleo de peixe rico em DHA. (A-D) níveis de citocinas detectados no cérebro dos animais nos dias 7 e 20 após a infecção. (E-G) níveis de citocinas detectados no soro dos animais nos dias 7 e 20 após a infecção. (A e E) IFN- $\gamma$ ; (B) IL-6; (C e F) TNF- $\alpha$ ; (D e G) IL-10. Os resultados são referentes a dois experimentos independentes ( $n = 5$  camundongos/grupo) e os dados são demonstrados por meio das médias  $\pm$  SEM. \* indica a diferença significativa entre os grupos com  $p < 0,05$ . dpi = dias pós-infecção; control = controle, animais não tratados e não infectados; PbA = *Plasmodium berghei* ANKA.

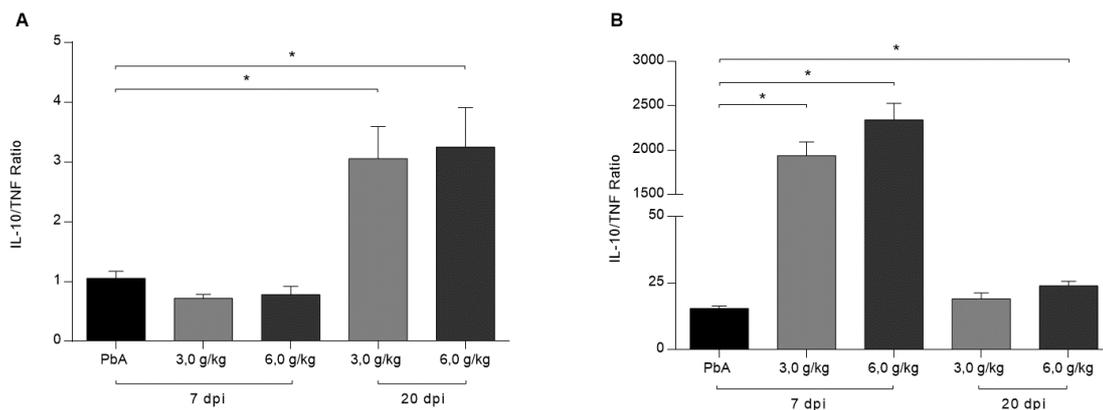


Figura 17: perfis anti e pró-inflamatórios em camundongos tratados e infectados com PbA. Razão entre os níveis de IL-10/TNF- $\alpha$  (A) no soro e (B) no cérebro dos animais. \* indica diferença significativamente estatística entre os grupos com  $p < 0,05$ . dpi = dias pós infecção; PbA = *Plasmodium berghei* ANKA.

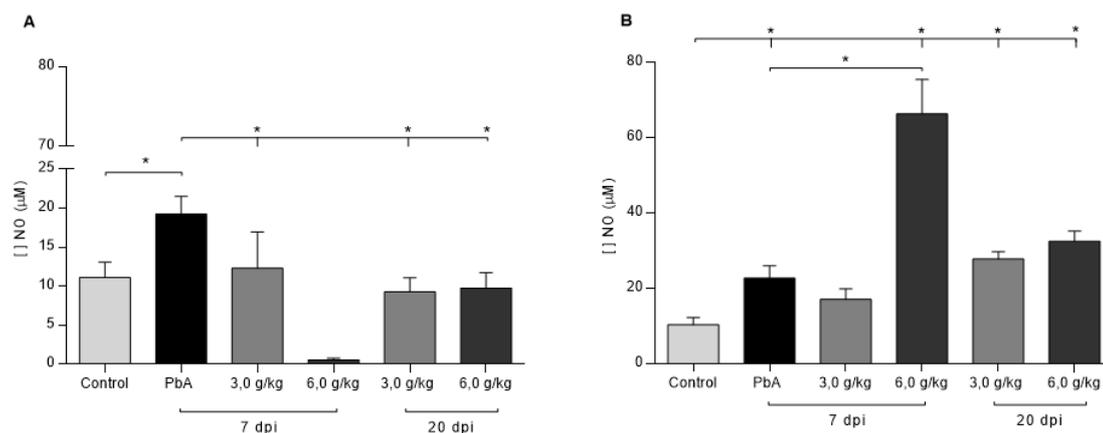


Figura 18: quantificação dos níveis de óxido nítrico em camundongos tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectados por PbA. Níveis de óxido nítrico presentes no (A) soro (B) cérebro dos animais. Os resultados são referentes a dois experimentos independentes ( $n = 5$  camundongos/grupo) e os dados são demonstrados por meio das médias  $\pm$  SEM. \* indica a diferença significativa entre os grupos com  $p < 0,05$ . dpi = dias pós-infecção; control = controle, animais não tratados e não infectados; PbA = *Plasmodium berghei* ANKA.

## **5.5 Efeito do tratamento com óleo de peixe rico em DHA no perfil fenotípico de células do baço**

Em relação as células presentes no baço dos animais, foi possível observar que houve um aumento no número de células (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup>Ly6G<sup>-</sup>) e neutrófilos (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) nos animais tratados com óleo de peixe rico em DHA (Figura 19 A-C). não houve diferença no número de células linfoides entre os grupos (Figura 9 D-E). Entretanto, os números de células T CD8 (TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) foi reduzido nos animais tratados com as maiores doses de DHA em relação aos animais não tratados e apenas infectados com PbA (Figura 19 F).

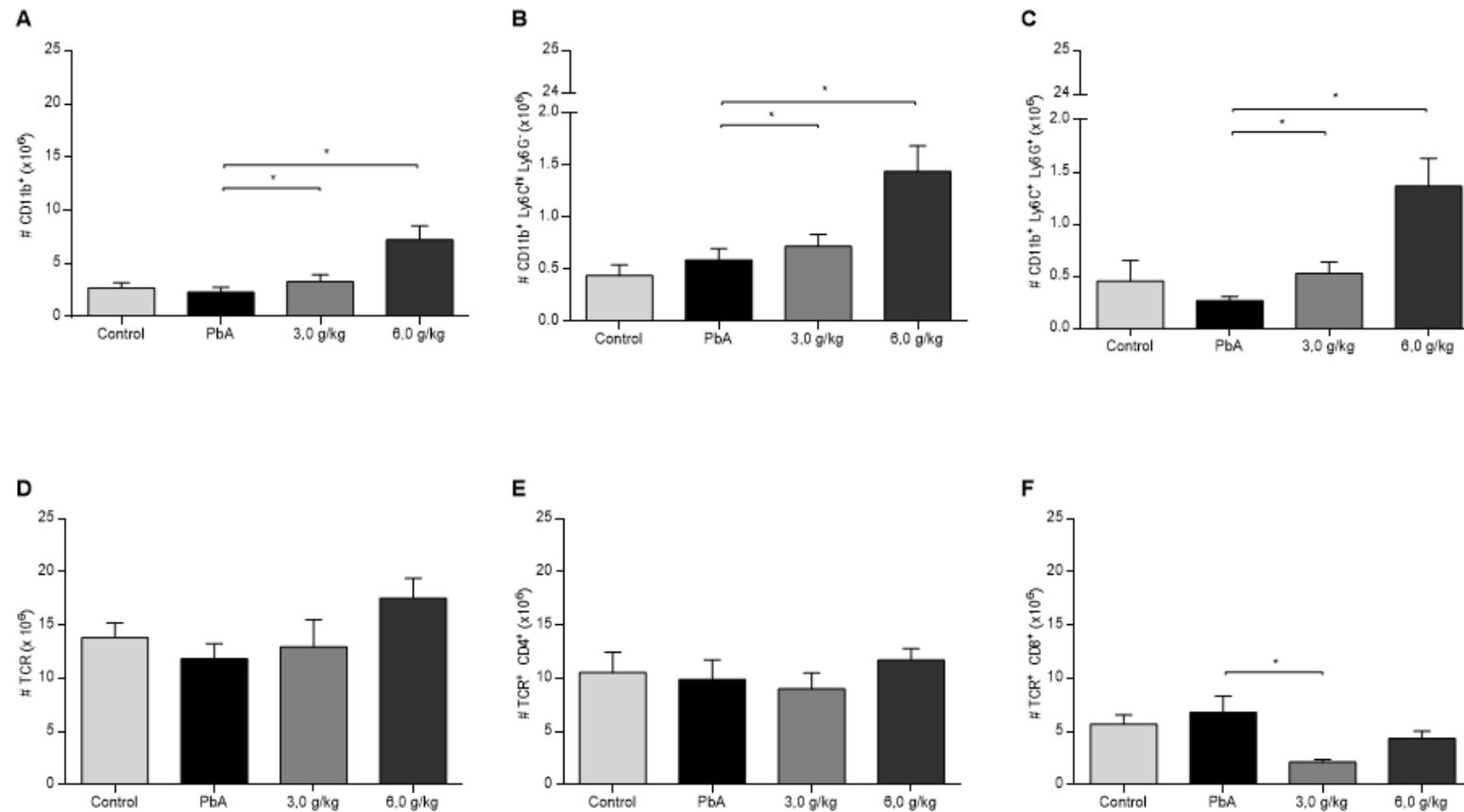


Figura 19: Populações celulares do baço de camundongos tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectados por PbA. (A) células mieloides (CD11b<sup>+</sup>); (B) monócitos inflamatórios (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup>Ly6G<sup>+</sup>); (C) neutrófilos (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>); (D) células linfoides (TCR<sup>+</sup>); (E) Células T CD4 (TCR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>); (F) células T CD8 (TCR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>). Dados expressos em números absolutos de baços coletados no sétimo dia após a infecção. Os resultados são expressos em média ± SEM ( $n = 5-6$  animais/grupo). \* indica diferença significativa entre os grupos considerando  $p < 0,05$ . Control = animais sem infecção e sem tratamento; PbA = *Plasmodium berghei* ANKA.

## 5.6 Número de neurônios piramidais não foi alterado durante a infecção malárica

A contagem de células neuronais foi realizada a partir das lâminas coradas com azul de toluidina. Para tal, 10 fotos foram capturadas do tecido, em microscópio com lentes de 20x, e as fotos foram então analisadas por meio do software ImageJ. Deste modo, foram contadas, manualmente, as células com as características dos neurônios piramidais tais como uma base e um ápice, além de possuírem ramificações de onde saem os dendritos. Não observamos nenhuma alteração na contagem de neurônios piramidais em relação aos animais não tratados e tratados, independente da dose utilizada para o tratamento (Figura 20).

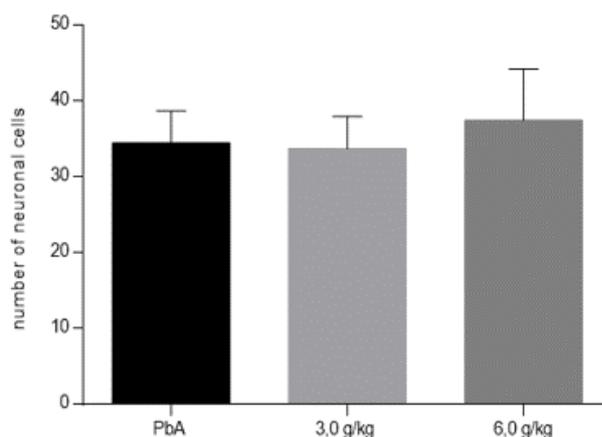


Figura 20. Contagem de células neuronais nos camundongos infectados com PbA após tratamento com DHA. PbA: *Plasmodium berghei* ANKA

Os resultados obtidos foram publicados em formato de artigo para a revista “*The Journal of Nutritional Biochemistry*” intitulado: “*DHA-RICH FISH OIL PLAYS PROTECTIVE ROLE AGAINST EXPERIMENTAL CEREBRAL MALARIA BY CONTROLLING INFLAMMATORY AND MECHANICAL EVENTS FROM INFECTION*”. O artigo publicado pela revista encontra-se anexado a este documento (Anexo III).

## 6. DISCUSSÃO

Durante a realização deste estudo, foi possível corroborar a hipótese de que a suplementação de ômega-3 utilizando óleo de peixe rico em DHA, poderia proteger camundongos contra o desenvolvimento da MC. Observamos que, os animais apenas infectados com PbA, que não receberam tratamento, apresentaram 100% de mortalidade, diferindo dos que foram tratados com 1,5 g/kg, 3,0 g/kg e 6,0 g/kg de DHA – o que já era esperado, como observado previamente por Block e colaboradores em 1992. Além disto, é sabido que camundongos C57BL/6 tendem a desenvolver quadros de MC com tais taxas de mortalidade entre o 5º e o 10º dpi, além de apresentarem sinais clínicos clássicos (ataxia, tremores, perda de reflexos plantares, entre outros) (BAGOT *et al.*, 2002; CARROLL *et al.*, 2010). Em relação aos grupos tratados com ômega-3, nas diferentes dosagens de DHA, foi possível observar uma tendência dose dependente na sobrevivência dos animais, uma vez que animais tratados com as menores doses apresentaram menores taxas de sobrevivência e os animais tratados com a maior dose apresentaram maior taxa de sobrevivência, alcançando cerca de 80%.

Em relação a parasitemia sanguínea dos animais tratados com DHA, foi possível observar altos níveis de parasitemia, maiores que 20%. Animais tratados com 3,0 g/kg e 6,0 g/kg de DHA apresentaram diferença significativa entre os níveis de parasitemia nos 5º e 6º dias pós-infecção em relação aos animais que não receberam tratamento. Houve um controle da parasitemia até o 10º dia de infecção. Além disso, os animais apresentaram um aumento expressivo do baço, representado pelo índice esplênico, indicando maior atividade por este órgão em relação aos animais que desenvolveram MC. Tanto o aumento do baço quanto a alta carga parasitária são indicativos de uma infecção prolongada durante as infecções maláricas. Assim, nossos dados corroboram o observado em estudos anteriores uma vez que estes também apresentaram uma supressão na proliferação de espécies de *Plasmodium* após suplementação com óleo de peixe (FEVANG; SAAV; HOSTMARK, 1995; GODFREY, 1957; LEVANDER, O. A. *et al.*, 1989; MELARIRI *et al.*, 2012). Alguns autores relacionam essa supressão na carga parasitária a ausência de vitamina E na dieta utilizada, entretanto, já foi observado a redução da parasitemia de camundongos

infectados por PbA mesmo na presença de altos níveis de vitamina E (GODFREY, 1957).

A infecção malárica conta com diversos componentes, além da presença do parasito, que podem causar danos graves ao hospedeiro. Um desses exemplos é a hemozoína, um metabólito do parasito liberado na corrente sanguínea durante o rompimento das hemácias durante o ciclo eritrocítico. Já foi observado por Eugenin e colaboradores que a hemozoína é capaz de causar danos a neurônios e astrócitos, causando toxicidade celular e apoptose (EUGENIN; MARTINEY; BERMAN, 2019). Outro exemplo é o acúmulo de hemácias parasitadas e não parasitadas, além de células e componentes do sistema imune, como leucócitos e plaquetas, que se aderem ao endotélio capilar de pacientes que desenvolvem MC. Em regiões de alta endemicidade, já foi observado no cérebro de crianças que morreram devido ao desenvolvimento de MC a presença de hemozoína e plaquetas acumuladas nos micro vasos (GRAU *et al.*, 2003). Deste modo, no presente estudo, pudemos observar que os animais tratados com óleo de peixe rico em DHA não desenvolveram danos teciduais decorrentes do acúmulo de células nos capilares sanguíneos.

O DHA e EPA são moléculas com propriedades anti-inflamatórias e capazes de alterar mecanismos de ativação das plaquetas (GOODNIGHT; HARRIS; CONNOR, 1981; LI, Kelei *et al.*, 2014; VON SCHACKY *et al.*, 1986). Já foi observado que o DHA é uma molécula capaz de inibir a expressão de ICAM-1 induzido por TNF- $\alpha$  no endotélio durante doenças cardiovasculares (LIN, Hung Chih *et al.*, 2019; LIU, Kai Li *et al.*, 2016; YANG, Ya Chen *et al.*, 2013) e que a expressão desta molécula de adesão está relacionada a danos causados durante a MC (BRIAN DE SOUZA; RILEY, 2002; MARIN *et al.*, 2021; TURNER *et al.*, 1994). Logo, a ausência de vasos obstruídos no cérebro de camundongos tratados pode estar relacionada a uma diminuição da expressão de moléculas de adesão. Entretanto estudos ainda precisam ser realizados para melhor investigar estes parâmetros. Ainda, a ausência de obstrução dos capilares pode estar relacionada a um perfil antitrombótico provocado pelas moléculas de ômega-3, uma vez que estas são capazes de alterar a proporção entre componentes pró-coagulantes e anticoagulantes (GOODNIGHT; HARRIS; CONNOR, 1981; VON SCHACKY *et al.*, 1986), o que influenciaria na formação dos

trombos durante os quadros de MC. Além disso, as moléculas de ômega-3 são capazes de disputar sítios de reação enzimática com o ácido araquidônico impedindo a formação de tromboxano A<sub>2</sub>, que está envolvida na cascata de coagulação (DINICOLANTONIO; OKEEFE, 2019; VON SCHACKY *et al.*, 1986).

Alterações na membrana de células podem ser associadas com agravamento de algumas doenças. Na malária, Scaccabarozi e colaboradores observaram que a alteração lipídica do tecido pulmonar de camundongos foi associada com a síndrome respiratória aguda (SCACCABAROZZI *et al.*, 2015). Ainda, a alteração de lipídeos em hemácias, bem como a alterações na sua arquitetura e maleabilidade, pode ocorrer durante a infecção malárica contribuindo para a patogênese da infecção e aumento da função esplênica (NEVEU; LAVAZEC, 2019). Também foi observado que alterações na bicamada lipídica de eritrócitos foi responsável pela adesão de células em quadros de pacientes diabéticos (WALI *et al.*, 1988). Além da alteração da arquitetura da célula, o estresse oxidativo também é importante para a conformação das hemácias, e pode afetar enzimas e a manutenção da composição lipídica e organizacional das células (KUYPERS *et al.*, 2007). O DHA é conhecido como uma molécula que reduz o estresse oxidativo, a peroxidação de lipídeos e a flexibilidade da membrana dos eritrócitos (DINICOLANTONIO; OKEEFE, 2019; YANG, Bo *et al.*, 2018). Deste modo, poderia estar associado ao controle do desenvolvimento da MC e da alteração da disposição da membrana das hemácias nos animais quando tratados profilaticamente na infecção malárica.

Os animais utilizados neste estudo foram pesados antes do início do tratamento e após 15 dias, antes da infecção experimental com PbA. Deste modo, pudemos observar que não houve alteração no peso corporal, o que já era esperado, uma vez que trabalhos já demonstraram a associação entre a suplementação com óleo de peixe e a redução na gordura corporal (KIM, Hyoun Ju; TAKAHASHI; EZAKI, 1999; KIM, Minji *et al.*, 2015). Outro fator observado foi a redução do peso corporal após a infecção por PbA. Animais infectados, independente do tratamento recebido, apresentaram perda de peso que pode ser relacionada a incapacidade do animal de recorrer a fonte energética, a desidratação e a fraqueza resultante da anemia que

estes podem desenvolver ao apresentar altas cargas parasitárias (ATAIDE *et al.*, 2020).

Observamos que os animais tratados com DHA apresentaram menor desenvolvimento de edema e comprometimento da barreira hematoencefálica em relação aos animais que não receberam tratamento com óleo de peixe, desta forma, podemos inferir que este teve um papel fundamental na proteção contra esses danos. Um dos mecanismos nos quais o DHA tem ação neuroprotetiva é na diminuição do edema cerebral e também na proteção da barreira hematoencefálica por meio da produção de neuroprotetinas (BAZAN, 2005; HONG, Sung Ha *et al.*, 2015; MARCHESELLI *et al.*, 2003; PAN *et al.*, 2009). Durante a MC, tanto em animais experimentais quanto em humanos, o comprometimento da barreira hematoencefálica e o edema estão associados aos piores prognósticos relacionados ao agravamento da doença (KAMPONDENI *et al.*, 2018; NEWTON *et al.*, 1994; PENET *et al.*, 2005; SEYDEL *et al.*, 2015). O rompimento da barreira endotelial no desenvolvimento de MC pode ser associado ao processo inflamatório iniciado nos capilares sanguíneos, com a formação de *knobs* e *clumpings* (HONG, Sung Ha *et al.*, 2015), além da ação de células imunes como o linfócitos T CD8, que atuam por meio da liberação de granzimas (CHANG *et al.*, 2001; HUGGINS *et al.*, 2017).

Em relação aos níveis de citocinas presentes no soro dos animais, foram encontrados baixos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-6 nos animais tratados, diferentemente do observado nos animais que apenas foram desafiados com PbA. Apesar de tratados com 3,0 e 6,0 g/kg de DHA, os animais apresentaram elevados níveis de TNF- $\alpha$  em relação aos animais que não receberam tratamento. Interessantemente, animais tratados também apresentaram altos níveis de IL-10 em comparação ao grupo apenas infectado. Esses dados observados vão de acordo com o que foi relatado na literatura e sugerem que a diminuição dos receptores de IFN- $\gamma$  levam a proteção contra a MC em modelos animais (AMANI *et al.*, 2000; HUNT; GRAU, 2003). Em humanos também já foi descrito que altos níveis de IFN- $\gamma$  estão presentes durante o quadro de MC (RINGWALD *et al.*, 1991), e da mesma forma, elevados níveis de IL-6 também já foram observados durante essa síndrome (DIEYE *et al.*, 2016; LYKE *et al.*, 2004; MANDALA *et al.*, 2017). Apesar dos elevados níveis de TNF- $\alpha$  serem relacionados ao

desenvolvimento de MC em diversos trabalhos (GRAU *et al.*, 1987; HUNT; GRAU, 2003), os níveis observados neste estudo não estão claramente associados com este quadro grave da malária. Já foram observados estudos com camundongos transgênicos (TNF- $\alpha$  knockout) (LOVEGROVE *et al.*, 2008) e em crianças que receberam anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$  (VAN HENSBROEK *et al.*, 1996) que estes não apresentaram diferença no desenvolvimento da MC, o que leva ao questionamento se realmente esta citocina é essencial para o desenvolvimento da MC. Por outro lado, os níveis elevados de IL-10 estão relacionados a casos em que há resistência ao desenvolvimento da malária grave em camundongos e em humanos (DAY *et al.*, 1999; KOSSODO *et al.*, 1997; KURTZHALS *et al.*, 1999). Estudos já demonstraram que moléculas de ômega-3, tais como DHA e EPA, atuam diretamente na produção de IL-10 (SIERRA *et al.*, 2008), o que poderia estar associado com estes elevados níveis apresentados pelos grupos tratados. Os mecanismos que envolvem a citocina IL-10 durante o quadro de MC estariam relacionados a diminuição da produção de TNF- $\alpha$  (HUNT; GRAU, 2003). A relação entre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido cerebral tem grande importância quando determinadas *in situ* (HUNT; GRAU, 2003). Deste modo, observamos que, apesar de existirem elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias nos animais tratados, quando comparamos aos níveis de IL-10, esta está em predominância no tecido cerebral, tanto no d7 de avaliação quanto no d20. Deste modo, é possível levantar uma hipótese de que possa haver uma modulação nos receptores a serem expressos no tecido, como a expressão de ICAM-1 (LIN, Y. *et al.*, 2015).

Em relação aos níveis de óxido nítrico presentes no cérebro, 80% dos animais tratados com 6,0 g/kg de DHA não apresentaram sinais clínicos de MC, mas apresentaram altos níveis de NO no tecido cerebral. Podemos assim sugerir que esta molécula imunomodulatória pode atuar na proteção contra o desenvolvimento dessa síndrome, como já foi observado por Serghides e colaboradores em um estudo que utilizou NO inalatório para prevenir o desenvolvimento de MC em camundongos (SERGHIDES *et al.*, 2011). Já foi observado também que se os níveis de NO são reduzidos há um agravamento nos sintomas associados a MC (GRAMAGLIA *et al.*, 2006). Do mesmo modo que IL-10, as moléculas de NO têm papel na regulação da expressão de moléculas de adesão do endotélio cerebral e também na ativação de

plaquetas e de leucócitos, atuando também com um papel anti-inflamatório no tecido (BOGDAN, 2001; LIU, Xiaoshun *et al.*, 2007; SERIROM *et al.*, 2003). A alteração no formato dos eritrócitos de animais infectados por PbA e não tratados com óleo de peixe rico em DHA poderia estar influenciando no aumento dos níveis de NO observados devido ao estresse oxidativo presente na membrana destas células (KUYPERS *et al.*, 2007). Já foi observado que os metabólitos liberados durante as infecções maláricas, como, por exemplo, a hemozoína e grupamentos heme, são potentes indutores de estresse oxidativo, e isso faz com que a membrana dos eritrócitos esteja sob estresse oxidativo (DAS & NANDA, 1999; PERCÁRIO *et al.*, 2012). Estudos já observaram que ácidos graxos poli-insaturados, como o DHA, limitam o estresse oxidativo, o que contribuiria para a manutenção da arquitetura das células infectadas (60).

Os ácidos graxos são moléculas que possuem grande importância na ativação do sistema imune, no perfil de resposta a ser ativado durante infecções e em propriedades regulatórias a serem executadas pelo organismo (CALDER, 2017). Assim, o perfil de células apresentadas pelo baço dos animais após tratamento e infecção com PbA foi investigado. Observamos um grande número de células expressando o marcador CD11b, característico de células mieloides, principalmente no baço dos animais tratados com 6,0 g/kg de DHA. Neutrófilos e monócitos são células que possuem este marcador em sua membrana, e se mostraram aumentados nos animais pertencentes a este grupo. A incorporação de moléculas de ômega-3 na membrana de neutrófilos tem importância na produção de maresinas, protetinas e resolvinas, que são moléculas notórias na proteção contra diferentes tipos de infecção (GUTIÉRREZ; SVAHN; JOHANSSON, 2019; SERHAN *et al.*, 2015). Alguns estudos já demonstraram que a incorporação de ômega-3 na membrana de neutrófilos leva a uma inibição na migração destas células (GUTIÉRREZ; SVAHN; JOHANSSON, 2019). Entretanto, outro estudo demonstrou que há um aumento na migração destas células para o baço após dieta com ácidos graxos poli-insaturados, atrasando a sua morte celular (SVAHN *et al.*, 2019). Além disso, foi observado *in vitro* um aumento na atividade fagocítica de neutrófilos após incubação com DHA, o que pode contribuir grandemente para controlar infecções de diferentes naturezas (GORJÃO *et al.*, 2006; PASCHOAL *et al.*, 2013). Ainda em relação aos neutrófilos, estas células são

relacionadas também a produção de IL-10 em bovinos, camundongos e humanos, sendo assim uma possível produtora e colaboradora para os altos níveis de IL-10 observados nos animais tratados (BOARI *et al.*, 2012; LEWKOWICZ *et al.*, 2016; LI, Lei *et al.*, 2019). Além disso, é conhecida a importância que os neutrófilos possuem no combate a infecções parasitárias, uma vez que atuam fortemente contra potenciais patógenos por meio da ação de redes extracelulares dos neutrófilos (*neutrophil extracellular traps* - NETs) (PEROBELLI *et al.*, 2015; ROSALES, 2018). Diante do elevado repertório de atividades, o mecanismo pelo qual os neutrófilos estariam agindo sob a ação de DHA ainda necessita ser melhor investigado.

Continuando as análises de células presentes no baço dos animais foi possível observar que houve uma redução na frequência das células T CD8<sup>+</sup> nos animais que não desenvolveram MC, diferindo do que foi observado em outros estudos. Monk e colaboradores observaram que ômega-3 poderia ser capaz de induzir um aumento de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no baço de camundongos (MONK *et al.*, 2013), enquanto outros estudos não demonstraram observar nenhuma diferença no perfil de células apresentado (GUTIÉRREZ; SVAHN; JOHANSSON, 2019). Dentre uma das possíveis variáveis que causam danos a barreira hematoencefálica durante a MC, a secreção de granzimas por células T CD8<sup>+</sup> são de grande importância para o agravamento do quadro (BELNOUE *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2001; HOWLAND *et al.*, 2015).

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, pudemos concluir que:

- O uso profilático com ômega-3 rico em DHA é capaz de proteger contra o desenvolvimento da MC em modelo murino, refletida na manutenção das condições clínicas e aumento de sua sobrevivência;
- O uso de ômega-3 rico em DHA influenciou no curso do desenvolvimento parasitário ao longo do estudo;
- Altas doses de DHA contida no óleo de peixe melhoram as funções hepáticas e renais de animais infectados;
- Nas doses utilizadas o ômega-3 rico em DHA é capaz de prevenir o cérebro contra danos induzidos pela infecção por *P. berghei* ANKA;
- O tratamento com ômega-3 induz predomínio de citocinas com perfil anti-inflamatório sérico e *in situ* (no cérebro);
- Níveis aumentados de NO no tecido cerebral de animais tratados com ômega 3 parecem contribuir para a proteção contra a MC;
- Hemácias de animais tratados com ômega-3 apresentaram menos deformações e mantiveram seu formato bicôncavo, o que não ocorreu nos animais somente infectados;
- O tratamento com o ômega-3 rico em DHA induz alterações celulares no baço em relação a animais não tratados com perceptível aumento de células mieloides (neutrófilos e monócitos inflamatórios) e redução células T CD8<sup>+</sup>.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDALLA, S. H. Peripheral blood and bone marrow leucocytes in Gambian children with malaria: numerical changes and evaluation of phagocytosis. **Annals of Tropical Paediatrics**, vol. 8, no. 4, p. 250–8, 1988. DOI 10.1080/02724936.1988.11748582. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2467614>.

AKBAR, M.; CALDERON, F.; WEN, Z.; KIM, H. Y. Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 102, no. 31, p. 10858–10863, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502903102>.

AMANI, V.; VIGÁRIO, A. M.; BELNOUE, E.; MARUSSIG, M.; FONSECA, L.; MAZIER, D.; RÉNIA, L. Involvement of IFN- $\gamma$  receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. **European Journal of Immunology**, vol. 30, no. 6, p. 1646–1655, 2000. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200006\)30:6<1646::AID-IMMU1646>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200006)30:6<1646::AID-IMMU1646>3.0.CO;2-0).

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, vol. 12, no. 2, p. 220–4, 2006. DOI 10.1038/nm1350. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16429144> <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm1350>.

ANSTEY, N. M.; DOUGLAS, N. M.; POESPOPRODJO, J. R.; PRICE, R. N. **Plasmodium vivax: Clinical Spectrum, Risk Factors and Pathogenesis**. [S. l.]: Elsevier, 2012. vol. 80, . DOI 10.1016/B978-0-12-397900-1.00003-7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00003-7>.

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; MILAZZO, L.; CORBELLINO, M. *Plasmodium knowlesi*: The emerging zoonotic malaria parasite. **Acta Tropica**, vol. 125, no. 2, p. 191–201, 2013. DOI 10.1016/j.actatropica.2012.10.008. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.008>.

ARESE, P.; SCHWARZER, E. Malarial pigment (haemozoin): A very active “inert” substance. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, vol. 91, no. 5, p. 501–516, 1997. <https://doi.org/10.1080/00034989760879>.

ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. **The Lancet**, vol. 391, no. 10130, p. 1608–1621, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30324-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30324-6).

ATAIDE, B. J. de A.; KAUFFMANN, N.; MENDES, N. de S. F.; TORRES, M. L. M.; DOS ANJOS, L. M.; PASSOS, A. da C. F.; DE MORAES, S. A. S.; BATISTA, E. de J. O.; HERCULANO, A. M.; OLIVEIRA, K. R. H. M. Melatonin Prevents Brain Damage and Neurocognitive Impairment Induced by Plasmodium Berghei ANKA Infection in Murine Model of Cerebral Malaria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 10, no. September, p. 1–12, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.541624>.

BAGOT, S.; BOUBOU, M. I.; CAMPINO, S.; BEHRSCHEIDT, C.; GORGETTE, O.; GUÉNET, J. L.; PENHA-GONÇALVES, C.; MAZIER, D.; PIED, S.; CAZENAVE, P. A. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by Plasmodium berghei ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. **Infection and Immunity**, vol. 70, no. 4, p. 2049–2056, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.2049-2056.2002>.

BANO, N.; ROMANO, J. D.; JAYABALASINGHAM, B.; COPPENS, I. Cellular interactions of Plasmodium liver stage with its host mammalian cell. **International Journal for Parasitology**, vol. 37, no. 12, p. 1329–1341, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.005>.

BARUCH, D. I.; MA, X. C.; SINGH, H. B.; BI, X.; PASLOSKE, B. L.; HOWARD, R. J. Identification of a Region of PfEMP1 that mediates adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. **Blood**, vol. 90, no. 9, p. 3766–3775, 1997. .

BAZAN, N. G. Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. **Molecular Neurobiology**, vol. 32, no. 1, p. 89–103, 2005.

<https://doi.org/10.1385/mn:32:1:089>.

BELKOUCH, M.; HACHEM, M.; ELGOT, A.; VAN, A. Lo; PICQ, M.; GUICHARDANT, M.; LAGARDE, M.; BERNOUD-HUBAC, N. The pleiotropic effects of omega-3 docosahexaenoic acid on the hallmarks of Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 38, p. 1–11, 2016. DOI 10.1016/j.jnutbio.2016.03.002. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.002>.

BELNOUE, E.; KAYIBANDA, M.; VIGARIO, A. M.; DESCHEMIN, J.-C.; ROOIJEN, N. van; VIGUIER, M.; SNOUNOU, G.; RÉNIA, L. On the Pathogenic Role of Brain-Sequestered  $\alpha\beta$  CD8 + T Cells in Experimental Cerebral Malaria . **The Journal of Immunology**, vol. 169, no. 11, p. 6369–6375, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6369>.

BERENDT, A. R.; SIMMONS, D. L.; TANSEY, J.; NEWBOLD, C. I.; MARSH, K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum. **Nature**, vol. 341, no. 6237, p. 57–59, 1989. <https://doi.org/10.1038/341057a0>.

BERENDT, A. R.; TUMER, G. D. H.; NEWBOLD, C. I. Cerebral malaria: The sequestration hypothesis. **Parasitology Today**, vol. 10, no. 10, p. 412–414, 1994. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90238-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90238-0).

BLACKMAN, B. M. J.; HEIDRICH, H.; DONACHIE, S.; MCBRIDE, J. S.; HOLDER, A. A. A single Fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **J. Exp. Med**, vol. I, no. July, p. 379–382, 1990. .

BLOK, W. L.; VOGELS, M. T. E.; CURFS, J. H. A. J.; ELING, W. M. C.; BUURMAN, W. A.; VAN DER MEER, J. W. M. Dietary fish-oil supplementation in experimental gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 165, no. 5, p. 898–903, 1992. <https://doi.org/10.1093/infdis/165.5.898>.

BOARI, J. T.; VESELY, M. C. A.; BERMEJO, D. A.; RAMELLO, M. C.; MONTES, C. L.; CEJAS, H.; GRUPPI, A.; RODRÍGUEZ, E. V. A. IL-17RA signaling

reduces inflammation and mortality during trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathogens**, vol. 8, no. 4, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002658>.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response - Nature Immunology. **Nature immunology**, vol. 2, no. 10, p. 907–916, 2001. Available at: <http://www.nature.com/nijournal/v2/n10/abs/ni1001-907.html%0Apapers3://publication/uuid/07B0E5D9-42E7-4B68-A95C-E820803D435F>.

BOIVIN, M. J.; BANGIRANA, P.; BYARUGABA, J.; OPOKA, R. O.; IDRO, R.; JUREK, A. M.; JOHN, C. C. Cognitive impairment after cerebral malaria in children: A prospective study. **Pediatrics**, vol. 119, no. 2, 2007. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-2027>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Malária — Ministério da Saúde. 2023. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria-1>. Accessed on: 9 Mar. 2023.

BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; DE PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M.; JÚNIOR, C. B.; SILVA, S.; AREAS, A. L. L.; PELAJO-MACHADO, M.; DE ALVARENGA, D. A. M.; DA SILVA SANTELLI, A. C. F.; ALBUQUERQUE, H. G.; CRAVO, P.; SANTOS DE ABREU, F. V.; PETERKA, C. L.; ZANINI, G. M.; SUÁREZ MUTIS, M. C.; PISSINATTI, A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DE BRITO, C. F. A.; ... DANIEL-RIBEIRO, C. T. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, vol. 5, no. 10, p. e1038–e1046, 2017. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30333-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9).

BRAZ-DE-MELO, H. A.; PASQUARELLI-DO-NASCIMENTO, G.; CORRÊA, R.; DAS NEVES ALMEIDA, R.; DE OLIVEIRA SANTOS, I.; PRADO, P. S.; PICOLO, V.; DE BEM, A. F.; PIZATO, N.; MAGALHÃES, K. G. Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 1–12, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56556-y>.

BRIAN DE SOUZA, J.; RILEY, E. M. Cerebral malaria: The contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, vol. 4, no. 3, p. 291–300, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01541-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01541-1).

BRIM, R.; MBOMA, S.; SEMRUD-CLIKEMAN, M.; KAMPONDENI, S.; MAGEN, J.; TAYLOR, T.; LANGFITT, J. Cognitive outcomes and psychiatric symptoms of retinopathy-positive cerebral malaria: Cohort description and baseline results. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 97, no. 1, p. 225–231, 2017. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0020>.

BRUCE-CHWATT, L. J. Alphonse Laveran's discovery 100 years ago and today's global fight against malaria. **Journal of the Royal Society of Medicine**, vol. 74, 1981. .

BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Introduction to fatty acids and lipids. **World Review of Nutrition and Dietetics**, vol. 112, p. 1–16, 2015. <https://doi.org/10.1159/000365423>.

BURRACK, K. S.; HART, G. T.; HAMILTON, S. E. Contributions of natural killer cells to the immune response against Plasmodium. **Malaria Journal**, vol. 18, no. 1, p. 1–9, 2019. DOI 10.1186/s12936-019-2953-1. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2953-1>.

CALDER, P. C. Docosahexaenoic acid. **Annals of Nutrition and Metabolism**, vol. 69, no. 1, p. 8–21, 2016. <https://doi.org/10.1159/000448262>.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, vol. 1851, no. 4, p. 469–484, 2015. DOI 10.1016/j.bbalip.2014.08.010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.010>.

CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From

molecules to man. **Biochemical Society Transactions**, vol. 45, no. 5, p. 1105–1115, 2017. <https://doi.org/10.1042/BST20160474>.

CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. **Nutrients**, vol. 2, no. 3, p. 355–374, 2010. <https://doi.org/10.3390/nu2030355>.

CARROLL, R. W.; WAINWRIGHT, M. S.; KIM, K. Y.; KIDAMBI, T.; GÓMEZ, N. D.; TAYLOR, T.; HALDAR, K. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. **PLoS ONE**, vol. 5, no. 10, p. 1–12, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013124>.

CASALS-PASCUAL, C.; KAI, O.; CHEUNG, J. O. P.; WILLIAMS, S.; LOWE, B.; NYANOTI, M.; WILLIAMS, T. N.; MAITLAND, K.; MOLYNEUX, M.; NEWTON, C. R. J. C.; PESHU, N.; WATT, S. M.; ROBERTS, D. J. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. **Blood**, vol. 108, no. 8, p. 2569–2577, 2006. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-018697>.

CETIN, I.; KOLETZKO, B. Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation. **Current opinion Clin. Nutr. Metab. Care**, vol. 11, no. 3, p. 6, 2008. .

CHAKRAVARTY, S.; COCKBURN, I. A.; KUK, S.; OVERSTREET, M. G.; SACCI, J. B.; ZAVALA, F. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. **Nature Medicine**, vol. 13, no. 9, p. 1035–1041, 2007. <https://doi.org/10.1038/nm1628>.

CHANG, W. L.; JONES, S. P.; LEFER, D. J.; WELBOURNE, T.; SUN, G.; YIN, L.; SUZUKI, H.; HUANG, J.; GRANGER, D. N.; VAN DER HEYDE, H. C. CD8+ T-cell depletion ameliorates circulatory shock in Plasmodium berghei-infected mice. **Infection and Immunity**, vol. 69, no. 12, p. 7341–7348, 2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7341-7348.2001>.

CHEN, L.; ZHANG, Z. H.; SENDO, F. Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Clinical and Experimental Immunology**, vol. 120, no. 1, p. 125–133, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01196.x>.

CHOTIVANICH, K.; UDOMSANGPETCH, R.; MCGREADY, R.; PROUX, S.; NEWTON, P.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J. Central Role of the Spleen in Malaria Parasite Clearance. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 185, no. 10, p. 1538–1541, 2002. DOI 10.1086/340213. Available at: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/340213>.

COPPI, A.; NATARAJAN, R.; PRADEL, G.; BENNETT, B. L.; JAMES, E. R.; ROGGERO, M. A.; CORRADIN, G.; PERSSON, C.; TEWARI, R.; SINNIS, P. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 208, no. 2, p. 341–356, 2011. <https://doi.org/10.1084/jem.20101488>.

COPPI, A.; TEWARI, R.; BISHOP, J. R.; BENNETT, B. L.; LAWRENCE, R.; ESKO, J. D.; BILLKER, O.; SINNIS, P. Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to Plasmodium Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Host Cells. **Cell Host and Microbe**, vol. 2, no. 5, p. 316–327, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.002>.

COSTANTINI, L.; MOLINARI, R.; FARINON, B.; MERENDINO, N. Impact of omega-3 fatty acids on the gut microbiota. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, no. 12, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18122645>.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, vol. 124, no. 4, p. 755–766, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006>.

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, vol. 167, no. 3, p. 610–624, 2016. DOI 10.1016/j.cell.2016.07.055. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & vectors**, vol. 3, no. 1, p. 5, 2010. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-5>.

CUTTS, E. E.; LAASCH, N.; REITER, D. M.; TRENKER, R.; SLATER, L. M.; STANSFELD, P. J.; VAKONAKIS, I. Structural analysis of P. falciparum KAHRP

and PfEMP1 complexes with host erythrocyte spectrin suggests a model for cytoadherent knob protrusions. **PLoS Pathogens**, vol. 13, no. 8, p. 1–28, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006552>.

DAY, N. P. J.; HIEN, T. T.; SCHOLLAARDT, T.; LOC, P. P.; VAN CHUONG, L.; CHAU, T. T. H.; MAI, N. T. H.; PHU, N. H.; SINH, D. X.; WHITE, N. J.; HO, M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 180, no. 4, p. 1288–1297, 1999. <https://doi.org/10.1086/315016>.

DAY, N. P. J.; PHU, N. H.; MAI, N. T. H.; CHAU, T. T. H.; LOC, P. P.; CHUONG, L. Van; SINH, D. X.; HOLLOWAY, P.; HIEN, T. T.; WHITE, N. J. The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria. **Critical Care Medicine**, vol. 28, no. 6, p. 1833–1840, 2000. <https://doi.org/10.1097/00003246-200006000-00025>.

DE SOUSA, L. P.; DE ALMEIDA, R. F.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; DE MOURA CARVALHO, L. J.; E SOUZA, T. M.; DE SOUZA, D. O. G.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Long-term effect of uncomplicated Plasmodium berghei ANKA malaria on memory and anxiety-like behaviour in C57BL/6 mice. **Parasites and Vectors**, vol. 11, no. 1, p. 1–9, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2778-8>.

DE SOUZA, B. J.; HAFALLA, J. C. R.; RILEY, E. M.; COUPER, K. N. Cerebral malaria: Why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. **Parasitology**, vol. 137, no. 5, p. 755–772, 2010. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991715>.

DEANE, L. M. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 81, p. 5–14, 1986. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761986000600002>.

DEMEURE, C. E.; BRAHIMI, K.; HACINI, F.; MARCHAND, F.; PÉRONET, R.; HUERRE, M.; NICOLAS, J.; BREY, P.; ST, P. Leading to a Local Inflammatory Response and Lymph Node. **The Journal of Immunology**, 2005. .

DENDE, C.; MEENA, J.; NAGARAJAN, P.; PANDA, A. K.; RANGARAJAN, P. N.; PADMANABAN, G. Simultaneously targeting inflammatory response and

parasite sequestration in brain to treat Experimental Cerebral Malaria. **Scientific Reports**, vol. 5, no. July, p. 1–14, 2015. DOI 10.1038/srep12671. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep12671>.

DIEYE, Y.; MBENGUE, B.; DAGAMAJALU, S.; FALL, M. M.; LOKE, M. F.; NGUER, C. M.; THIAM, A.; VADIVELU, J.; DIEYE, A. Cytokine response during non-cerebral and cerebral malaria: Evidence of a failure to control inflammation as a cause of death in African adults. **PeerJ**, vol. 2016, no. 5, p. 1–20, 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.1965>.

DINICOLANTONIO, J. J.; OKEEFE, J. Importance of maintaining a low omega-6/omega-3 ratio for reducing platelet aggregation, coagulation and thrombosis. **Open Heart**, vol. 6, no. 1, p. 1–4, 2019. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2019-001011>.

DOROVINI-ZIS, K.; SCHMIDT, K.; HUYNH, H.; FU, W.; WHITTEN, R. O.; MILNER, D.; KAMIZA, S.; MOLYNEUX, M.; TAYLOR, T. E. The neuropathology of fatal cerebral malaria in Malawian children. **American Journal of Pathology**, vol. 178, no. 5, p. 2146–2158, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.016>.

DWIVEDI, H.; SINGH, S. K.; CHAUHAN, B. S.; GUNJAN, S.; TRIPATHI, R. Potential cerebral malaria therapy: Intramuscular arteether and Vitamin D co-administration. **Parasitology**, vol. 143, no. 12, p. 1557–1568, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001207>.

EEKA, P.; PHANITHI, P. B. Cytotoxic T Lymphocyte Granzyme-b mediates neuronal cell death during Plasmodium berghei ANKA induced experimental cerebral malaria. **Neuroscience Letters**, vol. 664, no. February 2017, p. 58–65, 2018. DOI 10.1016/j.neulet.2017.11.021. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.021>.

ENGLISH, M.; SAUERWEIN, R.; WARUIRU, C.; MOSOBO, M.; OBIERO, J.; LOWE, B.; MARSH, K. Acidosis in severe childhood malaria. **Qjm**, vol. 90, no. 9, 1997. .

ENGWERDA, C. R.; BEATTIE, L.; AMANTE, F. H. The importance of the spleen in malaria. **Trends in Parasitology**, vol. 21, no. 2, p. 75–80, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.11.008>.

EUGENIN, E. A.; MARTINEY, J. A.; BERMAN, J. W. The malaria toxin hemozoin induces apoptosis in human neurons and astrocytes: Potential role in the pathogenesis of cerebral malaria. **Brain Research**, vol. 1720, no. July, p. 146317, 2019. DOI 10.1016/j.brainres.2019.146317. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146317>.

FAO. **Fats and fatty acids in human nutrition. Proceedings of the Joint FAO/ November 10-14, 2008. Geneva, Switzerland.** [S. l.: s. n.], 2010. vol. 55, . <https://doi.org/10.1159/000228993>.

FEVANG, P.; SAAV, H.; HOSTMARK, A. T. Dietary fish oils and long-term malaria protection in mice. **Lipids**, vol. 30, no. 5, p. 437–441, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF02536302>.

FREVERT, U.; ENGELMANN, S.; ZOUGBÉDÉ, S.; STANGE, J.; NG, B.; MATUSCHEWSKI, K.; LIEBES, L.; YEE, H. Intravital observation of Plasmodium berghei sporozoite infection of the liver. **PLoS Biology**, vol. 3, no. 6, p. 1034–1046, 2005. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030192>.

FRIED, M.; DUFFY, P. E. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. **Science.**, vol. 272, no. 5267, p. 1502–4., 1996. <https://doi.org/10.1126/science.272.5267.1502>.

FRIED, M.; DUFFY, P. E. Malaria during pregnancy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol. 7, no. 6, p. 1–24, 2017. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025551>.

FUJIKAWA, M.; KAMITANI, T.; TUNRU, I. S.; YAMAZAKI, K.; HAMAZAKI, T. Antimalarial effects of purified and  $\alpha$ -tocopherol-fortified n-3 polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 4, no. 3, p. 153–157, 1993. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(93\)90043-V](https://doi.org/10.1016/0955-2863(93)90043-V).

GARDNER, M. J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; RICHARD, W.; CARLTON, J. M.; PAIN, A.; NELSON, K. E.; BOWMAN, S.; IAN, T.;

JAMES, K.; EISEN, J. A.; RUTHERFORD, K.; SALZBERG, S. L.; KYES, S.; CHAN, M.; NENE, V.; SHALLOM, S. J.; ... ALAN, H. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, vol. 419, no. 6906, 2002. <https://doi.org/10.1038/nature01097>.Genome.

GODFREY, D. G. Antiparasitic action of dietary cod liver oil upon *Plasmodium berghei* and its reversal by vitamin "E." **Experimental Parasitology**, vol. 6, no. 6, p. 555–565, 1957. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(57\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0014-4894(57)90038-3).

GODFREY, D. G. Influence of Dietary Cod liver oil upon *Trypanosoma congolense*, *T. cruzi*, *T. vivax* and *T. brucei*. vol. 268, p. 255–268, 1958. .

GOOD, M. F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C. R. DEVELOPMENT AND REGULATION OF CELL -MEDIATED IMMUNE RESPONSES TO THE BLOOD STAGES OF MALARIA : Implications for. **Annual review of immunology**, vol. 23, p. 69–99, 2005. DOI 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115638. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771566>.

GOODNIGHT, S. H.; HARRIS, W. S.; CONNOR, W. E. The effects of dietary  $\omega$ 3 fatty acids on platelet composition and function in man: A prospective, controlled study. **Blood**, vol. 58, no. 5, p. 880–885, 1981. DOI 10.1182/blood.v58.5.880.880. Available at: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V58.5.880.880>.

GORJÃO, R.; VERLENGIA, R.; LIMA, T. M. de; SORIANO, F. G.; BOAVENTURA, M. F. C.; KANUNFRE, C. C.; PERES, C. M.; SAMPAIO, S. C.; OTTON, R.; FOLADOR, A.; MARTINS, E. F.; CURI, T. C. P.; PORTIOLLI, É. P.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Effect of docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on human leukocyte function. **Clinical Nutrition**, vol. 25, no. 6, p. 923–938, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2006.03.004>.

GRAMAGLIA, I.; SOBOLEWSKI, P.; MEAYS, D.; CONTRERAS, R.; NOLAN, J. P.; FRANGOS, J. A.; INTAGLIETTA, M.; VAN DER HEYDE, H. C. Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. **Nature Medicine**, vol. 12, no. 12, p. 1417–1422, 2006. <https://doi.org/10.1038/nm1499>.

GRAU, G. E.; FAJARDO, L. F.; PIGUET, P.; ALLET, B.; LAMBERT, P.; VASSALLI, P. Tumor Necrosis Factor as an essential mediator in murine cerebral malaria. **Science**, vol. 237, no. 9, p. 1210–1212, 1987. .

GRAU, G. E.; MACKENZIE, C. D.; CARR, R. A.; REDARD, M.; PIZZOLATO, G.; ALLASIA, C.; CATALDO, C.; TAYLOR, T. E.; MOLYNEUX, M. E. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 187, no. 3, p. 461–466, 2003. <https://doi.org/10.1086/367960>.

GRIFFING, S. M.; TAUILL, P. L.; UDHAYAKUMAR, V.; SILVA-FLANNERY, L. A historical perspective on malaria control in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 110, no. 6, p. 701–718, 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150041>.

GUTIÉRREZ, S.; SVAHN, S. L.; JOHANSSON, M. E. Effects of omega-3 fatty acids on immune cells. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, no. 20, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20205028>.

HAQUE, A.; BEST, S. E.; UNOSSON, K.; AMANTE, F. H.; DE LABASTIDA, F.; ANSTEY, N. M.; KARUPIAH, G.; SMYTH, M. J.; HEATH, W. R.; ENGWERDA, C. R. Granzyme B Expression by CD8 + T Cells Is Required for the Development of Experimental Cerebral Malaria . **The Journal of Immunology**, vol. 186, no. 11, p. 6148–6156, 2011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003955>.

HARTMEYER, G. N.; STENSVOLD, C. R.; FABRICIUS, T.; MARMOLIN, E. S.; HOEGH, S. V.; NIELSEN, H. V.; KEMP, M.; VESTERGAARD, L. S. Plasmodium cynomolgi as Cause of Malaria in Tourist to Southeast Asia, 2018. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 25, no. 10, p. 1936–1939, 2019. <https://doi.org/10.3201/eid2510.190448>.

HASHIMOTO, M.; HOSSAIN, S. Fatty Acids: From Membrane Ingredients to Signaling Molecules. **Intech Open Limited**, 2018. .

HAWASS, Z. ; YEHA, Z. G.; ISMAIL, S.; KHAIRAT, R.; FATHALLA, D.; HASAN, N.; AHMED, A.; ELLEITHY, H.; BALL, M.; GABALLAH, F.; WASEF, S.;

FATEEN, M. P.; AMER, H.; GOSTNER, P.; SELIM, A.; ZINK, A.; M., C. Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family. **Journal of American Medical Association**, vol. 303, no. 7, 2010. .

HELLAND, I. B.; SMITH, L.; BLOMEN, B.; SAAREM, K.; SAUGSTAD, O. D.; DREVON, C. A. Effect of supplementing pregnant and lactating mothers with n-3 very-long-chain fatty acids on children's iq and body mass index at 7 years of age. **Pediatrics**, vol. 122, no. 2, 2008. DOI 10.1542/peds.2007-2762. Available at: [www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/](http://www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/). Accessed on: 20 Oct. 2021.

HONG, S.; GRONERT, K.; DEVCHAND, P. R.; MOUSSIGNAC, R. L.; SERHAN, C. N. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells: Autacoids in anti-inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, no. 17, p. 14677–14687, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300218200>.

HONG, S. H.; KHOUTOROVA, L.; BAZAN, N. G.; BELAYEV, L. Docosahexaenoic acid improves behavior and attenuates blood-brain barrier injury induced by focal cerebral ischemia in rats. **Experimental and Translational Stroke Medicine**, vol. 7, no. 1, p. 1–10, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13231-014-0012-0>.

HOWLAND, S. W.; CLASER, C.; POH, C. M.; GUN, S. Y.; RÉNIA, L. Pathogenic CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. **Seminars in Immunopathology**, vol. 37, no. 3, p. 221–231, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0476-6>.

HUGGINS, M.; JOHNSON, H.; JIN, F.; N'SONGO; HANSON, L.; LAFRANCE, S.; BUTLER, N.; HARTY, J.; JOHNSON, A. Perforin expression by CD8 T cells is sufficient to cause fatal brain edema during experimental cerebral malaria. **Infection and Immunity**, vol. 85, no. 5, p. 1–12, 2017. .

HUGHES, D. A.; PINDER, A. C.; PIPER, Z.; JOHNSON, I. T.; LUND, E. K. Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 63, no. 2, p. 267–272, 1996.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/63.2.267>.

HUNT, N. H.; GRAU, G. E. Cytokines: Accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. **Trends in Immunology**, vol. 24, no. 9, p. 491–499, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00229-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00229-1).

IDRO, R.; JENKINS, N. E.; NEWTON, C. R. J. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. **Lancet Neurology**, vol. 4, no. 12, p. 827–840, 2005. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70247-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70247-7).

KAMPONDENI, S. D.; BIRBECK, G. L.; SEYDEL, K. B.; BEARE, N. A.; GLOVER, S. J.; HAMMOND, C. A.; CHILINGULO, C. A.; TAYLOR, T. E.; POTCHEN, M. P. Noninvasive measures of brain edema predict outcome in pediatric cerebral malaria. **Surgical Neurology International**, vol. 9, no. 1, 2018. [https://doi.org/10.4103/sni.sni\\_297\\_17](https://doi.org/10.4103/sni.sni_297_17).

KIM, H.-Y. Neuroprotection by Docosahexaenoic Acid in Brain Injury. **Military Medicine**, vol. 179, no. 11S, p. 106–111, 2014. <https://doi.org/10.7205/milmed-d-14-00162>.

KIM, H. J.; TAKAHASHI, M.; EZAKI, O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, no. 36, p. 25892–25898, 1999. DOI 10.1074/jbc.274.36.25892. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.36.25892>.

KIM, M.; GOTO, T.; YU, R.; UCHIDA, K.; TOMINAGA, M.; KANO, Y.; TAKAHASHI, N.; KAWADA, T. Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. **Scientific Reports**, vol. 5, no. December, p. 1–12, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep18013>.

KNUTTGEN, H. J. The bone marrow of non-immune Europeans in acute malaria infection: a topical review. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, vol. 81, no. 5, p. 567–576, 1987. <https://doi.org/10.1080/00034983.1987.11812158>.

KOCHAR, D. K.; TANWAR, G. S.; KHATRI, P. C.; KOCHAR, S. K.; SENGAR, G. S.; GUPTA, A.; KOCHAR, A.; MIDDHA, S.; ACHARYA, J.; SAXENA, V.; PAKALAPATI, D.; GARG, S.; DAS, A. Clinical features of children hospitalized with malaria - A study from Bikaner, Northwest India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 83, no. 5, p. 981–989, 2010. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0633>.

KONG, W.; YEN, J. H.; VASSILIOU, E.; ADHIKARY, S.; TOSCANO, M. G.; GANEA, D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family. **Lipids in Health and Disease**, vol. 9, p. 1–10, 2010. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-12>.

KOSSODO, S.; MONSO, C.; JUILLARD, P.; VELU, T.; GOLDMAN, M.; GRAU, G. E. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. **Immunology**, vol. 91, no. 4, p. 536–540, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00290.x>.

KREY, G.; BRAISSANT, O.; L'HORSET, F.; KALKHOVEN, E.; PERROUD, M.; PARKER, M. G.; WAHLI, W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. **Molecular Endocrinology**, vol. 11, no. 6, p. 779–791, 1997. <https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0007>.

KRUGLIAK, M.; DEHARO, E.; SHALMIEV, G.; SAUVAIN, M.; MORETTI, C.; GINSBURG, H. Antimalarial effects of C18 fatty acids on *Plasmodium falciparum* in culture and *Plasmodium vinckei petteri* and *Plasmodium yoelli nigeriensis* in vivo. , p. 95–105, 1995. .

KUMARATILAKE, L. M.; ROBINSON, B. S.; FERRANTE, A.; POULOS, A. Antimalarial Properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: in vitro effects on *Plasmodium falciparum* and in vivo effects on *P. berghei*. **J. Clinical Investigation**, vol. 89, no. March, p. 961–967, 1992. .

KURTZHALS, J. A. L.; AKANMORI, B. D.; QUARM GOKA, B.; ADABAYERI, V.; NKRUMAH, F. K.; BEHR, C.; HVIID, L.; OTHORO, C.;

UDHAYAKUMAR, V. The cytokine balance in severe malarial anemia [5] (multiple letters). **Journal of Infectious Diseases**, vol. 180, no. 5, p. 1753–1755, 1999. <https://doi.org/10.1086/315077>.

KUYPERS, S. F. A.; CAPPELLINI, M. D.; VICHINSKY, E.; KUYPERS, F. A. RBCs and Hemoglobinopathies Membrane Lipid Alterations in Hemoglobinopathies. **RBCs and hemoglobinopathies**, , p. 68–73, 2007. .

LACERDA, M. V. G.; FRAGOSO, S. C. P.; ALECRIM, M. G. C.; ALEXANDRE, M. A. A.; MAGALHÃES, B. M. L.; SIQUEIRA, A. M.; FERREIRA, L. C. L.; ARAÚJO, J. R.; MOURÃO, M. P. G.; FERRER, M.; CASTILLO, P.; MARTIN-JAULAR, L.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; DEL PORTILLO, H.; ORDI, J.; ALONSO, P. L.; BASSAT, Q. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of plasmodium vivax malaria: To what extent does this parasite kill? **Clinical Infectious Diseases**, vol. 55, no. 8, p. 67–74, 2012. <https://doi.org/10.1093/cid/cis615>.

LALANCETTE-HÉBERT, M.; JULIEN, C.; CORDEAU, P.; BOHACEK, I.; WENG, Y. C.; CALON, F.; KRIZ, J. Accumulation of dietary docosahexaenoic acid in the brain attenuates acute immune response and development of postischemic neuronal damage. **Stroke**, vol. 42, no. 10, p. 2903–2909, 2011. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.620856>.

LEVANDER, O. A.; AGER, A. L.; MORRIS, V. C.; MAY, R. G. Qinghaosu, dietary vitamin E, selenium, and cod-liver oil: Effect on the susceptibility of mice to the malarial parasite Plasmodium yoelii. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 50, no. 2, p. 346–352, 1989. <https://doi.org/10.1093/ajcn/50.2.346>.

LEVANDER, O.; AGER, A.; MORRIS, V.; MAY, R. Menhaden-fish oil in a vitamin E-deficient diet: protection against chloroquine-resistant malaria in mice. **American Journal of Clinical Nutrition**, no. August, p. 1237–1239, 1989. .

LEWKOWICZ, N.; MYCKO, M. P.; PRZYGODZKA, P.; ÓWIKLIŃSKA, H.; CICHALEWSKA, M.; MATYSIAK, M.; SELMAJ, K.; LEWKOWICZ, P. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. **Mucosal Immunology**, vol. 9, no. 2, p. 364–378, 2016. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.66>.

LI, K.; HUANG, T.; ZHENG, J.; WU, K.; LI, D. Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor  $\alpha$ : A meta-analysis. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 2, p. 1–28, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088103>.

LI, L.; SI, H.; WU, S. W.; MENDEZ, J. O.; ZARLENGA, D.; TUO, W.; XIAO, Z. Characterization of IL-10-producing neutrophils in cattle infected with *Ostertagia ostertagi*. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 1–14, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56824-x>.

LIN, H. C.; LII, C. K.; LIN, A. H.; LI, C. C.; TSAI, C. H.; PAN, S. K.; YANG, Y. C.; HUANG, C. S.; RESHI, L.; CHEN, H. W. Docosahexaenoic acid inhibits TNF $\alpha$ -induced ICAM-1 expression by activating PPAR $\alpha$  and autophagy in human endothelial cells. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 134, no. June, p. 110811, 2019. DOI 10.1016/j.fct.2019.110811. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110811>.

LIN, Y.; XU, M.; WAN, J.; WEN, S.; SUN, J.; ZHAO, H.; LOU, M. Docosahexaenoic acid attenuates hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation after transient focal cerebral ischemia in rats. **Neuroscience**, vol. 301, p. 471–479, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.024>.

LINDNER, S. E.; MILLER, J. L.; KAPPE, S. H. I. Malaria Parasite Pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. **Cell Microbiology**, vol. 14, no. 3, 2012. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01734.x>. Malaria.

LIU, K. L.; YANG, Y. C.; YAO, H. T.; CHIA, T. W.; LU, C. Y.; LI, C. C.; TSAI, H. J.; LII, C. K.; CHEN, H. W. Docosahexaenoic acid inhibits inflammation via free fatty acid receptor FFA4, disruption of TAB2 interaction with TAK1/TAB1 and downregulation of ERK-dependent Egr-1 expression in EA.hy926 cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, vol. 60, no. 2, p. 430–443, 2016. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500178>.

LIU, X.; HUANG, Y.; POKREISZ, P.; VERMEERSCH, P.; MARSBOOM, G.; SWINNEN, M.; VERBEKEN, E.; SANTOS, J.; PELLENS, M.; GILLIJNS, H.; VAN DE WERF, F.; BLOCH, K. D.; JANSSENS, S. Nitric Oxide Inhalation Improves

Microvascular Flow and Decreases Infarction Size After Myocardial Ischemia and Reperfusion. **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 50, no. 8, p. 808–817, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.04.069>.

LOVEGROVE, F. E.; GHARIB, S. A.; PEÑA-CASTILLO, L.; PATEL, S. N.; RUZINSKI, J. T.; HUGHES, T. R.; LILES, W. C.; KAIN, K. C. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. **PLoS Pathogens**, vol. 4, no. 5, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000068>.

LOVO-MARTINS, M. I.; MALVEZI, A. D.; DA SILVA, R. V.; ZANLUQUI, N. G.; TATAKIHARA, V. L. H.; CÂMARA, N. O. S.; DE OLIVEIRA, A. P. L.; PERON, J. P. S.; MARTINS-PINGE, M. C.; FRITSCHKE, K. L.; PINGE-FILHO, P. Fish oil supplementation benefits the murine host during the acute phase of a parasitic infection from *Trypanosoma cruzi*. **Nutrition Research**, vol. 41, p. 73–85, 2017. DOI 10.1016/j.nutres.2017.04.007. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2017.04.007>.

LYKE, K. E.; BURGESS, R.; CISSOKO, Y.; SANGARE, L.; DAO, M.; DIARRA, I.; KONE, A.; HARLEY, R.; PLOWE, C. V.; DOUMBO, O. K.; SZTEIN, M. B. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. **Infection and Immunity**, vol. 72, no. 10, p. 5630–5637, 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5630-5637.2004>.

MANDALA, W. L.; MSEFULA, C. L.; GONDWE, E. N.; DRAYSON, M. T.; MOLYNEUX, M. E.; MACLENNANA, C. A. Cytokine Profiles in Malawian Children Presenting with Uncomplicated Malaria. **Clinical and Vaccine Immunology**, vol. 24, no. 4, p. 1–11, 2017. .

MARCHESELLI, V. L.; HONG, S.; LUKIW, W. J.; TIAN, X. H.; GRONERT, K.; MUSTO, A.; HARDY, M.; GIMENEZ, J. M.; CHIANG, N.; SERHAN, C. N.; BAZAN, N. G. Novel Docosanoids Inhibit Brain Ischemia-Reperfusion-mediated Leukocyte Infiltration and Pro-inflammatory Gene Expression. **Journal of Biological Chemistry**,

vol. 278, no. 44, p. 43807–43817, 2003. DOI 10.1074/jbc.M305841200. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M305841200>.

MARIN, A. A.; MURILLO, O.; SUSSMANN, R. A.; ORTOLAN, L. S.; BATTAGELLO, D. S.; DE CASTRO QUIRINO, T.; BITTENCOURT, J. C.; EPIPHANIO, S.; KATZIN, A. M.; CARVALHO, L. J. M. Perillyl alcohol reduces parasite sequestration and cerebrovascular dysfunction during experimental cerebral malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 65, no. 5, p. 1–14, 2021. <https://doi.org/10.1128/AAC.00004-21>.

MARTINS, Y. C.; CARVALHO, L. J. D. M.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Challenges in the determination of early predictors of cerebral malaria: Lessons from the human disease and the experimental murine models. **NeuroImmunoModulation**, vol. 16, no. 2, p. 134–145, 2009. <https://doi.org/10.1159/000180268>.

MATHEW, A. J.; GEORGE, J. Acute kidney injury in the tropics. **Annals of Saudi Medicine**, vol. 31, no. 5, p. 451–456, 2011. <https://doi.org/10.4103/0256-4947.84620>.

MELARIRI, P.; CAMPBELL, W.; ETUSIM, P.; SMITH, P. In Vitro and in Vivo Antimalarial Activity of Linolenic and Linoleic Acids and their Methyl Esters. **Advanced Studies in Biology**, vol. 4, no. 7, p. 333–349, 2012. .

MILES, E. A.; THIES, F.; WALLACE, F. A.; POWELL, J. R.; HURST, T. L.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. **Clinical Science**, vol. 100, no. 1, p. 91–100, 2001. <https://doi.org/10.1042/CS20000198>.

MILLER, B. Y. L. H.; AIKAWA, M.; JOHNSON, J. G.; SHIROISHI, T. Interaction between cytochalasin b-treated malarial parasites and erythrocytes - attachment and junction formation. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 149, no. 1517, p. 172–184, 1979. .

MILNER, D. A. Malaria pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol. 8, no. 1, p. 1–11, 2018. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>.

MOLYNEUX, M. E.; TAYLOR, T. E.; WIRIMA, J. J.; BORGSTEIN, A. Clinical features and prognostic indicators in paediatric cerebral malaria: A study of 131 comatose malawian children. **Quarterly Journal of Medicine**, vol. 71, no. 265, p. 441–459, 1989. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068338>.

MONK, J. M.; HOU, T. Y.; TURK, H. F.; MCMURRAY, D. N.; CHAPKIN, R. S. n3 PUFAs reduce mouse CD4+ T-Cell ex vivo polarization into Th17 Cells. **Journal of Nutrition**, vol. 143, no. 9, p. 1501–1508, 2013. <https://doi.org/10.3945/jn.113.178178>.

MORRIS, M. C.; EVANS, D. A.; BIENIAS, J. L.; TANGNEY, C. C.; BENNETT, D. A.; WILSON, R. S.; AGGARWAL, N.; SCHNEIDER, J. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, vol. 60, no. 7, p. 940–946, 2003. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.7.940>.

MORRISSETTE, N. S.; SIBLEY, L. D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, vol. 66, no. 1, p. 21–38; table of contents, 2002. DOI 10.1128/MMBR.66.1.21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=120781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MOTA, M. M.; PRADE, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C. R.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRIGUEZ, A. Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. **Science**, vol. 291, no. 5501, p. 141, 2001. Available at: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ehh&AN=4019612&site=ehost-live>.

NAMUTANGULA, B.; NDEEZI, G.; BYARUGABA, J. S.; TUMWINE, J. K. Mannitol as adjunct therapy for childhood cerebral malaria in Uganda: A randomized clinical trial. **Malaria Journal**, vol. 6, p. 4–9, 2007. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-138>.

NERLICH, A. Paleopathology and Paleomicrobiology of Malaria. **Paleomicrobiology of Humans**, p. 155–160, 2016.

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.poh-0006-2015>.

NEVEU, G.; LAVAZEC, C. Erythrocyte Membrane Makeover by Plasmodium falciparum Gametocytes. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, no. November, p. 1–8, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02652>.

NEWTON, C. R. J. C.; PESHU, N.; KENDALL, B.; KIRKHAM, F. J.; SOWUNMI, A.; WARUIRU, C.; MWANGI, I.; MURPHY, S. A.; MARSH, K. Brain swelling and ischaemia in Kenyans with cerebral malaria. **Archives of Disease in Childhood**, vol. 70, no. 4, p. 281–287, 1994. <https://doi.org/10.1136/adc.70.4.281>.

NISHITSUJI, K.; HOSONO, T.; NAKAMURA, T.; BU, G.; MICHIKAWA, M. Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain barrier model. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 286, no. 20, p. 17536–17542, 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225532>.

NOVAK, T. E.; BABCOCK, T. A.; JHO, D. H.; HELTON, W. S.; ESPAT, N. J. NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, vol. 284, no. 1, p. L84-9, 2003. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12388359](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12388359).

OCKENHOUSE, C. F.; TANDON, N. N.; MAGOWAN, C.; JAMIESON, G. A.; CHULAY, J. D. Identification of a Platelet Membrane Glycoprotein as a Falciparum Malaria Sequestration Receptor by were C ), ( B ( A ) erythrocytes was added to strain parasitemia ). of P . falciparum ( 7 % parasitemia ), or to human erythrocytes infected with the K- ( . 1988. .

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, vol. 9, no. 115, 2010. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.03.0166>.

OMMI, N. B.; ABDULLAH, M.; GURUPRASAD, L.; BABU, P. P. Docosahexaenoic acid is potent against the growth of mature stages of Plasmodium falciparum; inhibition of hemozoin polymerization a possible target. **Parasitology**

**International**, vol. 89, p. 102581, 1 Aug. 2022.  
<https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2022.102581>.

PAIN, A.; FERGUSON, D. J. P.; KAI, O.; URBAN, B. C.; LOWE, B.; MARSH, K.; ROBERTS, D. J. Platelet-mediated clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 98, no. 4, p. 1805–1810, 2001. DOI 10.1073/pnas.98.4.1805. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.98.4.1805>.

PAN, H. C.; KAO, T. K.; OU, Y. C.; YANG, D. Y.; YEN, Y. J.; WANG, C. C.; CHUANG, Y. H.; LIAO, S. L.; RAUNG, S. L.; WU, C. W.; CHIANG, A. N.; CHEN, C. J. Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 20, no. 9, p. 715–725, 2009. DOI 10.1016/j.jnutbio.2008.06.014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.06.014>.

PASCHOAL, V. A.; VINOLO, M. A. R.; CRISMA, A. R.; MAGDALON, J.; CURTI, R. Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid differentially modulate rat neutrophil function in vitro. **Lipids**, vol. 48, no. 2, p. 93–103, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11745-012-3726-6>.

PASLOSKE, B. L.; HOWARD, R. J. Pasloske & Howard Adherence of Malaria-Infected Red Cells Malaria, the Red Cell, and the Endothelium. **Annu. Rev. Med**, vol. 45, p. 283–95, 1994. Available at: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).

PATRICK, R. P. Role of phosphatidylcholine-DHA in preventing APOE4-associated Alzheimer's disease. **FASEB Journal**, vol. 33, no. 2, p. 1554–1564, 2019. <https://doi.org/10.1096/fj.201801412R>.

PENET, M. F.; VIOLA, A.; CONFORT-GOUNY, S.; LE FUR, Y.; DUHAMEL, G.; KOBER, F.; IBARROLA, D.; IZQUIERDO, M.; COLTEL, N.; GHARIB, B.; GRAU, G. E.; COZZONE, P. J. Imaging experimental cerebral malaria in vivo: Significant role of ischemic brain edema. **Journal of Neuroscience**, vol. 25, no. 32, p. 7352–7358, 2005. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1002-05.2005>.

PEROBELLI, S. M.; GALVANI, R. G.; GONÇALVES-SILVA, T.; XAVIER, C. R.; NÓBREGA, A.; BONOMO, A. Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 48, no. 8, p. 665–675, 2015. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154524>.

PODOBA, J. E.; STEVENSON, M. M. CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. **Infect Immun**, vol. 59, no. 1, p. 51–58, 1991. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1898902](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1898902).

POESPOPRODJO, J. R.; HASANUDDIN, A.; FOBIA, W.; SUGIARTO, P.; KENANGALEM, E.; LAMPAH, D. A.; TJITRA, E.; PRICE, R. N.; ANSTEY, N. M. Case report: Severe congenital malaria acquired in utero. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 82, no. 4, p. 563–565, 2010. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0744>.

POTCHEN, M. J.; KAMPONDENI, S. D.; SEYDEL, K. B.; HAACKE, E. M.; SINYANGWE, S. S.; MWENECHANYA, M.; GLOVER, S. J.; MILNER, D. A.; ZELI, E.; HAMMOND, C. A.; UTRIAINEN, D.; LISHIMPI, K.; TAYLOR, T. E.; BIRBECK, G. L. 1.5 Tesla Magnetic Resonance Imaging To Investigate Potential Etiologies of Brain Swelling in Pediatric Cerebral Malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 98, no. 2, p. 497–504, 2018. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0309>.

PROMENEUR, D.; LUNDE, L. K.; AMIRY-MOGHADDAM, M.; AGRE, P. Protective role of brain water channel AQP4 in murine cerebral malaria. **PNAS**, vol. 10, no. 3, p. 1035–1040, 2013. DOI 10.1073/pnas.1220566110. Available at: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1220566110](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1220566110). Accessed on: 8 Nov. 2021.

PUSKÁS, L. G.; KITAJKA, K.; NYAKAS, C.; BARCELO-COBLIJN, G.; FARKAS, T. Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 100, no. 4, p. 1580, 18 Feb. 2003. DOI 10.1073/PNAS.0337683100. Available at: [/pmc/articles/PMC149875/](http://pmc/articles/PMC149875/). Accessed on: 20 Oct. 2021.

RADTKE, A. J.; KASTENMÜLLER, W.; ESPINOSA, D. A.; GERNER, M. Y.; TSE, S. W.; SINNIS, P.; GERMAIN, R. N.; ZAVALA, F. P.; COCKBURN, I. A. Lymph-Node Resident CD8 $\alpha$ + Dendritic Cells Capture Antigens from Migratory Malaria Sporozoites and Induce CD8+ T Cell Responses. **PLoS Pathogens**, vol. 11, no. 2, p. 1–23, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004637>.

RAJAHRAM, G. S.; BARBER, B. E.; WILLIAM, T.; MENON, J.; ANSTEY, N. M.; YEO, T. W. Deaths due to Plasmodium knowlesi malaria in Sabah, Malaysia: Association with reporting as Plasmodium malariae and delayed parenteral artesunate. **Malaria Journal**, vol. 11, p. 1–7, 2012. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-284>.

REES, D.; MILES, E. A.; BANERJEE, T.; WELLS, S. J.; ROYNETTE, C. E.; WAHLE, K. W. J.; CALDER, P. C. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: A comparison of young and older men. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 83, no. 2, p. 331–342, 2006. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.331>.

RÉNIA, L.; POTTER, S. M.; MAUDUIT, M.; ROSA, D. S.; KAYIBANDA, M.; DESCHEMIN, J. C.; SNOUNOU, G.; GRÜNER, A. C. Pathogenic T cells in cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, vol. 36, no. 5, p. 547–554, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.02.007>.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in blood feeding by arthropods. **Ann Rev Entomol**, vol. 32, no. 92, p. 463–478, 1987. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.en.32.010187.002335>.

RINGWALD, P.; PEYRON, F.; VUILLEZ, J. P.; TOUZE, J. E.; LE BRAS, J.; DELORON, P. Levels of cytokines in plasma during Plasmodium falciparum malaria attacks. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 29, no. 9, p. 2076–2078, 1991. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.9.2076-2078.1991>.

ROGERSON, S. J.; CHAIYAROJ, S. C.; NG, K.; REEDER, J. C.; BROWN, G. V. Chondroitin sulfate a is a cell surface receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 182, no. 1, p. 15–20, 1995. <https://doi.org/10.1084/jem.182.1.15>.

ROSALES, C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? **Frontiers in Physiology**, vol. 9, no. FEB, p. 1–17, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>.

RUDIN, W.; QUESNIAUX, V.; FAVRE, N.; BORDMANN, G. Malaria toxins from *P. chabaudi chabaudi* AS and *P. berghei* ANKA cause dyserythropoiesis in C57BL/6 mice. **Parasitology**, vol. 115 ( Pt 5, p. 467–74, 1997. DOI 10.1017/S0031182097001583. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9368897>.

SAKAI, C.; ISHIDA, M.; OHBA, H.; YAMASHITA, H.; UCHIDA, H.; YOSHIZUMI, M.; ISHIDA, T. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. **PLoS ONE**, vol. 12, no. 11, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187934>.

SALLARES, R.; GOMZI, S. Biomolecular archaeology of malaria. **Ancient Biomolecules**, vol. 3, p. 195–213, 2001. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Biomolecular+archaeology+of+malaria#0>.

SANTELLI, A. C. F. e S.; CAMILA PINTO DAMASCENO;; MARCHESINI;, C. L. P. P. B. Plano de Eliminação da Malária no Brasil. **Ministério da Saúde, Brasil**, 2016. Available at: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>.

SCACCABAROZZI, D.; DEROOST, K.; LAYS, N.; SALÈ, F. O.; VAN DEN STEEN, P. E.; TARAMELLI, D. Altered lipid composition of surfactant and lung tissue in murine experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **PLoS ONE**, vol. 10, no. 12, p. 1–16, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143195>.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature reviews. Immunology**, vol. 5, no. 9, p. 722–735, 2005. <https://doi.org/10.1038/nri1686>.

SCHWAB, J. M.; CHIANG, N.; ARITA, M.; SERHAN, C. N. Resolvin E1 and Protectin D1 Activate Inflammation-Resolution Programs. **Nature**, 2007. <https://doi.org/doi:10.1038/nature05877>.

SCOTT, B. L.; BAZAN, N. G. Membrane docosaehaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 86, no. 8, p. 2903–2907, 1989. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2903>.

SERGHIDES, L.; KIM, H.; LU, Z.; KAIN, D. C.; MILLER, C.; FRANCIS, R. C.; LILES, W. C.; ZAPOL, W. M.; KAIN, K. C. Inhaled nitric oxide reduces endothelial activation and parasite accumulation in the brain, and enhances survival in experimental cerebral malaria. **PLoS ONE**, vol. 6, no. 11, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027714>.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, J.; LEVY, B. D. Lipid mediators in the resolution of inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 7, no. 2, p. 1–20, 2015. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016311>.

SERHAN, C. N.; HONG, S.; GRONERT, K.; COLGAN, S. P.; DEVCHAND, P. R.; MIRICK, G.; MOUSSIGNAC, R. L. Resolvins: A family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 196, no. 8, p. 1025–1037, 2002. <https://doi.org/10.1084/jem.20020760>.

SERIROM, S.; RAHARJO, W. H.; CHOTIVANICH, K.; LOAREESUWAN, S.; KUBES, P.; HO, M. Anti-adhesive effect of nitric oxide on Plasmodium falciparum cytoadherence under flow. **American Journal of Pathology**, vol. 162, no. 5, p. 1651–1660, 2003. DOI 10.1016/S0002-9440(10)64299-X. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64299-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64299-X).

SEYDEL, K. B.; KAMPONDENI, S. D.; VALIM, C.; POTCHEN, M. J.; MILNER, D. A.; MUWALO, F. W.; BIRBECK, G. L.; BRADLEY, W. G.; FOX, L. L.; GLOVER, S. J.; HAMMOND, C. A.; HEYDERMAN, R. S.; CHILINGULO, C. A.; MOLYNEUX, M. E.; TAYLOR, T. E. Brain Swelling and Death in Children with Cerebral Malaria. **New England Journal of Medicine**, vol. 372, no. 12, p. 1126–1137, 2015. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1400116>.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids

and Their Health Benefits. **Annual Review of Food Science and Technology**, vol. 9, no. 1, p. 345–381, 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>.

SHIO, M. T.; KASSA, F. A.; BELLEMARE, M. J.; OLIVIER, M. Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. **Microbes and Infection**, vol. 12, no. 12–13, p. 889–899, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.07.001>.

SIERRA, S.; LARA-VILLOSLADA, F.; COMALADA, M.; OLIVARES, M.; XAUS, J. Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid equally incorporate as decosahexaenoic acid but differ in inflammatory effects. **Nutrition**, vol. 24, no. 3, p. 245–254, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.11.005>.

SILVA, P. S. Da; MEDIANO, M. F. F.; SILVA, G. M. S. Da; BRITO, P. D. De; CARDOSO, C. S. D. A.; ALMEIDA, C. F. De; SANGENIS, L. H. C.; PINHEIRO, R. O.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; BRASIL, P. E. A. A. Do; SOUSA, A. S. De. Omega-3 supplementation on inflammatory markers in patients with chronic Chagas cardiomyopathy: A randomized clinical study. **Nutrition Journal**, vol. 16, no. 1, p. 1–9, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12937-017-0259-0>.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, vol. 56, no. 8, p. 365–379, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6).

SINGH, B.; SUNG, L. K.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S. S. G.; COX-SINGH, J.; THOMAS, A. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. **Lancet**, vol. 363, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14713-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14713-7).

SOUZA, J. B.; HAFFALLA, J. C. R.; RILEY, E. M.; COUPER, K. N. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. Cambridge University Press, v. 137, issue 5, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182009991715>

STORM, J.; CRAIG, A. G. Pathogenesis of cerebral malaria-inflammation and cytoadherence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 4, no. JUL, p. 100, 2014. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2014.00100/BIBTEX>.

STURM, A.; AMINO, R.; SAND, C. van de; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J.-M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of Host Hepatocytes into Liver Sinusoids. **Science**, vol. 1287, no. 2006, 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1129720>.

SUTHERLAND, C. J.; POLLEY, S. D. **Genomic Insights Into the Past, Current, and Future Evolution of Human Parasites of the Genus Plasmodium**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. DOI 10.1016/B978-0-12-799942-5.00021-4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00021-4>.

SUTHERLAND, Colin J.; TANOMSING, N.; NOLDER, D.; OGUIKE, M.; JENNISON, C.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; DOLECEK, C.; HIEN, T. T.; DO ROSÁRIO, V. E.; AREZ, A. P.; PINTO, J.; MICHON, P.; ESCALANTE, A. A.; NOSTEN, F.; BURKE, M.; LEE, R.; BLAZE, M.; OTTO, T. D.; BARNWELL, J. W.; ... POLLEY, S. D. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite plasmodium ovale occur globally. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 201, no. 10, p. 1544–1550, 2010. <https://doi.org/10.1086/652240>.

SVAHN, S. L.; GUTIÉRREZ, S.; ULLERYD, M. A.; NOOKAEW, I.; OSLA, V.; BECKMAN, F.; NILSSON, S.; KARLSSON, A.; JANSSON, J. O.; JOHANSSON, M. E. Dietary polyunsaturated fatty acids promote neutrophil accumulation in the spleen by altering chemotaxis and delaying cell death. **Infection and Immunity**, vol. 87, no. 8, p. 1–14, 2019. <https://doi.org/10.1128/IAI.00270-19>.

TACHADO, S. D.; GEROLD, P.; MCCONVILLE, M. J.; BALDWIN, T.; QUILICI, D.; SCHWARZ, R. T.; SCHOFIELD, L. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase c-dependent signaling pathway. **The Journal of Immunology**, no. 156, p. 1897–1907, 1995. .

TAVARES, J.; FORMAGLIO, P.; THIBERGE, S.; MORDELET, E.; VAN ROOIJEN, N.; MEDVINSKY, A.; MÉNARD, R.; AMINO, R. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 210, no. 5, p. 905–915, 2013. <https://doi.org/10.1084/jem.20121130>.

TAYLOR, W. R. J.; HANSON, J.; TURNER, G. D. H.; WHITE, N. J.; DONDORP, A. M. Respiratory manifestations of malaria. **Chest**, vol. 142, no. 2, p. 492–505, 2012. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2655>.

THUMWOOD, C. M.; CLARK, I. A.; HUNT, N. H.; COWDEN, W. B. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. **Parasitology**, vol. 96, no. 3, p. 579–589, 1988. <https://doi.org/10.1017/S0031182000080203>.

TJITRA, E.; ANSTEY, N. M.; SUGIARTO, P.; WARIKAR, N.; KENANGALEM, E.; KARYANA, M.; LAMPAH, D. A.; PRICE, R. N. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: A prospective study in Papua, Indonesia. **PLoS Medicine**, vol. 5, no. 6, p. 0890–0899, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050128>.

TROTTEIN, F.; TRIGLIA, T.; COWMAN, A. F. Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and Plasmodia. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 74, no. 2, p. 129–141, 1995. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02489-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)02489-1).

TURNER, G. D. H.; MORRISON, H.; JONES, M.; DAVIS, T. M. E.; LOOAREESUWAN, S.; BULEY, I. D.; GATTER, K. C.; NEWBOLD, C. I.; PUKRITAYAKAMEE, S.; NAGACHINTA, B.; WHITE, N. J.; BERENDT, A. R. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. **American Journal of Pathology**, vol. 145, no. 5, p. 1057–1069, 1994. .

VAN DER JAGT, D. L.; HUNSAKER, L. A.; CAMPOS, N. M.; BAACK, B. R. d-Lactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 42, no. 2, p. 277–284, 1990. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90171-H](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90171-H).

VAN HENS BROEK, M. B.; PALMER, A.; ONYIORAH, E.; SCHNEIDER, G.; JAFFAR, S.; DOLAN, G.; MEMMING, H.; FRENKEL, J.; ENWERE, G.; BENNETT, S.; KWIATKOWSKI, D.; GREENWOOD, B. The effect of a monoclonal antibody to tumor

necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 174, no. 5, p. 1091–1097, 1996. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.5.1091>.

VANNICE, G.; RASMUSSEN, H. Position of the academy of nutrition and dietetics: Dietary fatty acids for healthy adults. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, vol. 114, no. 1, p. 136–153, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.11.001>.

VON SCHACKY, C.; FISCHER, S.; WEBER, P. C.; KASPER, K. Long-term Effects of Dietary Marine  $\omega$ -3 Fatty Acids upon Plasma and Cellular Lipids, Platelet Function, and Eicosanoid Formation in Humans. **Nutrition in Clinical Practice**, vol. 1, no. 1, p. 57, 1986. <https://doi.org/10.1177/088453368600100117>.

WALI, R. K.; JAFFE, S.; KUMAR, D.; KALRA, V. K. Alterations in organization of phospholipids in erythrocytes as factor in adherence to endothelial cells in diabetes mellitus. **Diabetes**, vol. 37, no. 1, p. 104–111, 1988. <https://doi.org/10.2337/diab.37.1.104>.

WARRELL, D. A.; LOOAREESUWAN, S.; WARRELL, M. J.; KASEMSARN, P.; INTARAPRASERT, R.; BUNNAG, D.; HARINASUTA, T. Dexamethasone proves deleterious in cerebral malaria. **The New England journal of medicine**, vol. 306, no. 6, 1982. .

WASSMER, S. C.; GRAU, G. E. R. Severe malaria: What's new on the pathogenesis front? **International Journal for Parasitology**, no. September, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.08.002>.

WASSMER, S. C.; TAYLOR, T.; MACLENNAN, A. C.; TAYLOR, T.; MOLYNEUX, M. E.; GRAU, G. E. Platelet-induced clumping of Plasmodium falciparum -infected erythrocytes from Malawian patients with cerebral malaria - possible modulation in vivo by thrombocytopenia. **Journal of In**, vol. 197, no. 1, p. 72–78, 2008. <https://doi.org/10.1086/523761.Platelet-induced>.

WEISS, G. E.; GILSON, P. R.; TAECHALERTPAISARN, T.; THAM, W. H.; DE JONG, N. W. M.; HARVEY, K. L.; FOWKES, F. J. I.; BARLOW, P. N.; RAYNER, J.

C.; WRIGHT, G. J.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. **PLoS Pathogens**, vol. 11, no. 2, p. 1–25, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004670>.

WHITE, N. J. Anaemia and malaria. **Malaria Journal**, vol. 17, no. 1, p. 1–17, 2018. DOI 10.1186/s12936-018-2509-9. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2509-9>.

WHO. Severe malaria. **Tropical Medicine and International Health**, vol. 19, no. 1, p. 7–131, 2014. <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01371-w>.

WILSON, N. O.; SOLOMON, W.; ANDERSON, L.; PATRICKSON, J.; PITTS, S.; BOND, V.; LIU, M.; STILES, J. K. Pharmacologic Inhibition of CXCL10 in Combination with Anti-Malarial Therapy Eliminates Mortality Associated with Murine Model of Cerebral Malaria. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 4, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060898>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Who Guidelines for malaria. , p. 219, 2021. .

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. [S. l.: s. n.], 2020. vol. WHO/HTM/GM, . <https://doi.org/ISBN 978 92 4 1564403>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. [S. l.: s. n.], 2022. vol. WHO/HTM/GM, . <https://doi.org/ISBN 978 92 4 1564403>.

YALCINDAG, E.; ELGUERO, E.; ARNATHAU, C.; DURAND, P.; AKIANA, J.; ANDERSON, T. J.; AUBOUY, A.; BALLOUX, F.; BESNARD, P.; BOGREAU, H.; CARNEVALE, P.; D'ALESSANDRO, U.; FONTENILLE, D.; GAMBOA, D.; JOMBART, T.; LE MIRE, J.; LEROY, E.; MAESTRE, A.; MAYXAY, M.; ... PRUGNOLLE, F. Multiple independent introductions of Plasmodium falciparum in South America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 109, no. 2, p. 511–516, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119058109>.

YAMAUCHI, L. M.; COPPI, A.; SNOUNOU, G.; SINNIS, P. Plasmodium

sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology**, vol. 9, no. 5, p. 1215–1222, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00861.x>.

YAN, Y.; JIANG, W.; SPINETTI, T.; TARDIVEL, A.; CASTILLO, R.; BOURQUIN, C.; GUARDA, G.; TIAN, Z.; TSCHOPP, J.; ZHOU, R. Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. **Immunity**, vol. 38, no. 6, p. 1154–1163, 2013. DOI 10.1016/j.immuni.2013.05.015. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.015>.

YANG, B.; LI, R.; MICHAEL GREENLIEF, C.; FRITSCHE, K. L.; GU, Z.; CUI, J.; LEE, J. C.; BEVERSDORF, D. Q.; SUN, G. Y. Unveiling anti-oxidative and anti-inflammatory effects of docosahexaenoic acid and its lipid peroxidation product on lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. **Journal of Neuroinflammation**, vol. 15, no. 1, p. 1–16, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1232-3>.

YANG, Y. C.; LII, C. K.; WEI, Y. L.; LI, C. C.; LU, C. Y.; LIU, K. L.; CHEN, H. W. Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF- $\kappa$ B pathways. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 24, no. 1, p. 204–212, 2013. DOI 10.1016/j.jnutbio.2012.05.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.05.003>.

YIN, J.; LI, H.; MENG, C.; CHEN, D.; CHEN, Z.; WANG, Y.; WANG, Z.; CHEN, G. Inhibitory effects of omega-3 fatty acids on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats: Possible involvement of G protein-coupled receptor 120/ $\beta$ -arrestin2/TGF- $\beta$  activated kinase-1 binding protein-1 signaling pathway. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, vol. 75, p. 11–22, 2016. DOI 10.1016/j.biocel.2016.03.008. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.03.008>.

ZHANG, W.; LI, P.; HU, X.; ZHANG, F.; CHEN, J.; GAO, Y. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection Wenting. **Frontiers in Bioscience**, no. 6, p. 978–988, 2011. .



## 9. ANEXOS

### Anexo I



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

#### CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/07/2019, analisou o protocolo nº. 019/2020 intitulado "Avaliação da atividade anti-inflamatória do ômega 3 presente em óleo de peixe na proteção contra o desenvolvimento de malária cerebral em modelo murino", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Kézia Katiani Gorza Scopel e colaboração de Bárbara Albuquerque Carpinter, a ser realizado no período de 01/09/2020 a 28/02/2023. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 241 camundongos C57BL/6 fêmeas com 6 a 8 semanas de idade, projeto a ser realizado no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – UFJF. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 019/2020 -CEUA about "Avaliação da atividade anti-inflamatória do ômega 3 presente em óleo de peixe na proteção contra o desenvolvimento de malária cerebral em modelo murino", under responsibility of Kézia Katiani Gorza Scopel and collaboration of Bárbara Albuquerque Carpinter is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 07/03/2020. For the development of this research 241 females of C57BL/6 mice with 6 to 8 weeks old will be delivered as requested in the period of 09/01/2020 to 02/28/2023. The Project will be performed at Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – UFJF. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora, 20 de julho de 2020.

Coordenadora  
CEUA

Vice-Coordenadora  
CEUA

## Anexo II

Tabela 2: Tabela utilizada para realização das avaliações clínicas dos animais após infecção com *Plasmodium berghei* ANKA.

Data: ___ / ___ / ___ - dpi: ___	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10
<b>Coordenação</b>										
Marcha (0-2)										
Balanço/Equilíbrio (0-2)										
<b>Comportamento exploratório</b>										
Desempenho Motor (0-2)										
<b>Força e Tônus</b>										
Posição do corpo (0-2)										
Força dos membros (0-2)										
<b>Reflexo e autopreservação</b>										
Fuga de toque (0-2)										
Reflexo pavilhão auricular (0-2)										
Reflexo plantar (0-2)										
Agressão (0-2)										
<b>Higiene</b>										
Grooming										
<b>SOMATÓRIO</b>										

## Anexo III



## RESEARCH PAPER

## DHA-rich fish oil plays a protective role against experimental cerebral malaria by controlling inflammatory and mechanical events from infection

Bárbara Albuquerque Carpinter<sup>a</sup>, Daniela Chaves Renhe<sup>a</sup>, Jéssica Correa Bezerra Bellei<sup>a</sup>, Carolina David Vieira<sup>a</sup>, Cinthia Magalhães Rodolphi<sup>a</sup>, Marcos Vinicius Rangel Ferreira<sup>b</sup>, Camila Simões de Freitas<sup>c</sup>, Adolfo Firmino da Silva Neto<sup>d</sup>, Eduardo Antônio Ferraz Coelho<sup>c</sup>, Bruno de Siqueira Mietto<sup>d</sup>, Flávia Lima Ribeiro Gomes<sup>b</sup>, Vinicius Novaes Rocha<sup>e</sup>, Kézia Katiani Gorza Scopel<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Parasitology, Microbiology and Immunology and Post-Graduation Program in Biological Science, Research Centre of Parasitology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Malaria Research, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup>Post-graduation Program in Health Sciences, Infectology and Tropical Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup>Department of Biology, Research Centre of Cellular Biology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

<sup>e</sup>Department of Veterinary Medicine, Research Centre of Pathology and Veterinary Histology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

Received 4 February 2023; received in revised form 17 May 2023; accepted 17 October 2023

## Abstract

Every year, thousands of children, particularly those under 5 years old, die because of cerebral malaria (CM). Following conventional treatment, approximately 25% of surviving individuals have lifelong severe neurocognitive sequelae. Therefore, improved conventional therapies or effective alternative therapies that prevent the severe infection are crucial. Omega-3 ( $\Omega$ -3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are known to have antioxidative and anti-inflammatory effects and protect against diverse neurological disorders, including Alzheimer's and Parkinson's diseases. However, little is known regarding the effects of  $\Omega$ -3 PUFAs against parasitic infections. In this study, C57BL/6 mice received supplemental treatment of a fish oil rich in the  $\Omega$ -3 PUFA, docosahexaenoic acid (DHA), which was started 15 days prior to infection with *Plasmodium berghei* ANKA and was maintained until the end of the study. Animals treated with the highest doses of DHA, 3.0 and 6.0 g/kg body weight, had 60 and 80% chance of survival, respectively, while all nontreated mice died by the 7th day postinfection due to CM. Furthermore, the parasite load during the critical period for CM development (5th to 11th day postinfection) was controlled in treated mice. However, after this period all animals developed high levels of parasitemia until the 20th day of infection. DHA treatment also effectively reduced blood-brain barrier (BBB) damage and brain edema and completely prevented brain hemorrhage and vascular occlusion. A strong anti-inflammatory profile was observed in the brains of DHA-treated mice, as well as, an increased number of neutrophil and reduced number of CD8<sup>+</sup> T leukocytes in the spleen. Thus, this is the first study to demonstrate that the prophylactic use of DHA-rich fish oil exerts protective effects against experimental CM, reducing the mechanical and immunological events caused by the *P. berghei* ANKA infection.

© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** malaria; cerebral malaria; DHA; omega-3.

## 1. Introduction

Malaria is an infectious parasitic disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, transmitted to humans through bites of

infected female mosquitoes of the genus *Anopheles*. Malaria still represents a serious public health problem worldwide. In 2020, malaria affected around 241 million people, causing approximately 627,000 deaths, with most of these deaths occurring in African children under 5 years of age [1].

Among the complications arising from malarial infection, the most serious is cerebral malaria (CM), which is commonly attributed to *Plasmodium falciparum* infection. The pathophysiology of human CM is complex and involves two central hypotheses: vascular occlusion and inflammation [2,3]. Vascular occlusion is suggested to occur through the adhesion of infected erythrocytes to the vascular endothelium with consequent obstruction of blood flow and cerebral hypoxia [4]. The second hypothesis suggests that CM is the result of an exacerbated inflammatory response, in

This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - Rede Mineira #00313-16 and APQ-1365-22), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 310272/2022-0) and Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/UFJF (Universidade Federal de Juiz de Fora). BAC is a FAPEMIG doctoral fellowship.

\* Corresponding author at: S/No Campus Universitário, 36036-900, Juiz de Fora, Brazil.

E-mail address: [keziagscopel@gmail.com](mailto:keziagscopel@gmail.com) (K.K.G. Scopel).

which Th1-type cytokines, particularly tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interferon (IFN)- $\gamma$ , play a central role [5,6]. These two hypotheses appear to be mutually dependent, and the complexity of this potentially fatal infection could be explained by dynamic interactions between these mechanisms [3,7].

CM affects approximately 1% of infected individuals, causing mortality rates between 15 and 25% [8]. Furthermore, approximately 25% of individuals who recover following conventional treatment have lifelong neurocognitive sequelae [9–11]. Thus, adjuvant therapies that positively aid conventional drugs to reduce the risk of a severe prognosis/sequelae are crucial [12,13].

Among the compounds that have anti-inflammatory and neuroprotective properties are the omega-3 polyunsaturated fatty acids ( $\Omega$ -3 PUFAs). The main  $\Omega$ -3 PUFAs are eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6). The molecular mechanisms by which EPA and DHA exert anti-inflammatory effects are associated with their concentration in cell membranes. The membranes of inflammatory cells are generally rich in the  $\Omega$ -6 fatty acid arachidonic acid (ARA), which acts as the main substrate for enzymes including cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX), and cytochrome P450 for the production of pro-inflammatory eicosanoids, such as prostaglandins and leukotrienes of series 2 and 4, respectively. The increased intake of  $\Omega$ -3 PUFAs in relation to  $\Omega$ -6 leads to a change in the fatty acid composition of cell membranes, increasing the EPA and DHA and decreasing the ARA content. As a result, the production of eicosanoids is shifted from eicosanoids of a pro-inflammatory type to those of an anti-inflammatory type, such as resolvins, protectins, and maresins; production of which also involves the COX and LOX pathways [14]. In addition,  $\Omega$ -3 PUFAs are able to interfere with raft formation within the membrane of inflammatory cells, thus preventing the activation of the NF- $\kappa$ B pathway via Toll-like receptor 4 (TLR-4). NF- $\kappa$ B is the main transcription factor involved in the expression of genes related to inflammation. EPA and DHA mobilized from the membrane by the enzyme phospholipase A2 also are capable of activating the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- $\gamma$ ), which has an anti-inflammatory effect since it interferes with the translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus [14,15].

Consistent with its anti-inflammatory and neuroprotective action, several studies have shown that low levels of DHA in the brain are associated with disorders such as Alzheimer's disease [16,17], and that DHA supplementation is able to increase tissue perfusion with consequent improvement in regions with cerebral ischemia [18,19]. DHA has also been shown to protect neuronal cells against the harmful effect of Zika virus infection *in vitro* [20]. Although the effect of  $\Omega$ -3 PUFAs has been investigated in parasitic diseases like Chagas disease and leishmaniasis [21,22], little is known about their contribution in preventing CM. Furthermore, the existing studies on  $\Omega$ -3 PUFAs in CM have only investigated the effect in terms of parasitemia and mortality in animal models [23,24]. The present study demonstrates that dietary supplementation with DHA-rich fish oil in C57BL/6 mice can substantially protect against CM by reducing inflammatory and mechanical events caused by the *Plasmodium* infection.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mice, infection, and treatment

Six-to-eight-week-old female C57BL/6 mice were obtained from the Reproduction Biology Center at the Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais, Brazil. Animals were housed in polypropylene cages, maintained in ventilated shelves (Alesco), with food and water *ad libitum*. All animal experiments were ap-

proved by the Ethics Committee on Animal Research from UFJF (protocol number # 19/2020).

Mice were treated daily, by gavage, with 200  $\mu$ L of fish oil (Essential Nutrition<sup>®</sup>) containing 1.5, 3.0, or 6.0 g DHA/kg body weight. After 15 days, mice were infected with  $10^5$  red blood cells (pRBCs) parasitized by the *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) strain and treatment continued until the mice were euthanized (7th or 20th day postinfection, dpi). To obtain the pRBCs for the experimental infections, two mice were infected intraperitoneally (i.p.) with 200  $\mu$ L of cryopreserved pRBCs. Five days after infection, the mice were anaesthetized (10% ketamine and 2% xylazine solution in 0.9% NaCl) and underwent cardiac puncture to obtain the pRBCs. The pRBCs were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) and the inoculum was adjusted to  $10^5$  pRBC/animal. Mice were infected (i.p.) and clinically evaluated daily. Control groups included PbA-infected only animals and nontreated and noninfected animals, indicated in the graphs as PbA and Control, respectively.

### 2.2. Clinical assessment, survival, and parasitemia

After the infection, mice were monitored daily according to an established protocol of the Rapid Murine Coma and Behavior Scale (RMCBS) [25]. The RMCBS evaluates neurological features and behavior of animals infected with PbA. Briefly, this protocol considers 10 parameters (gait, balance, motor performance, body position, limb strength, touch escape, pinna reflex, toe pinch, aggression, and grooming) that are evaluated and scored from 0 to 2, where 0 indicates dysfunctionality and 2 indicates normality. While mice with scores equal to 20 were considered completely healthy, those which developed CM showed a progressive decline in their clinical parameters, and were euthanized when the score was equal to or less than 5. Animals surviving the infection were euthanized on the 20th day of the study. All mice were weighed before starting the treatment, before infection (on the 15th day of treatment), and before euthanasia.

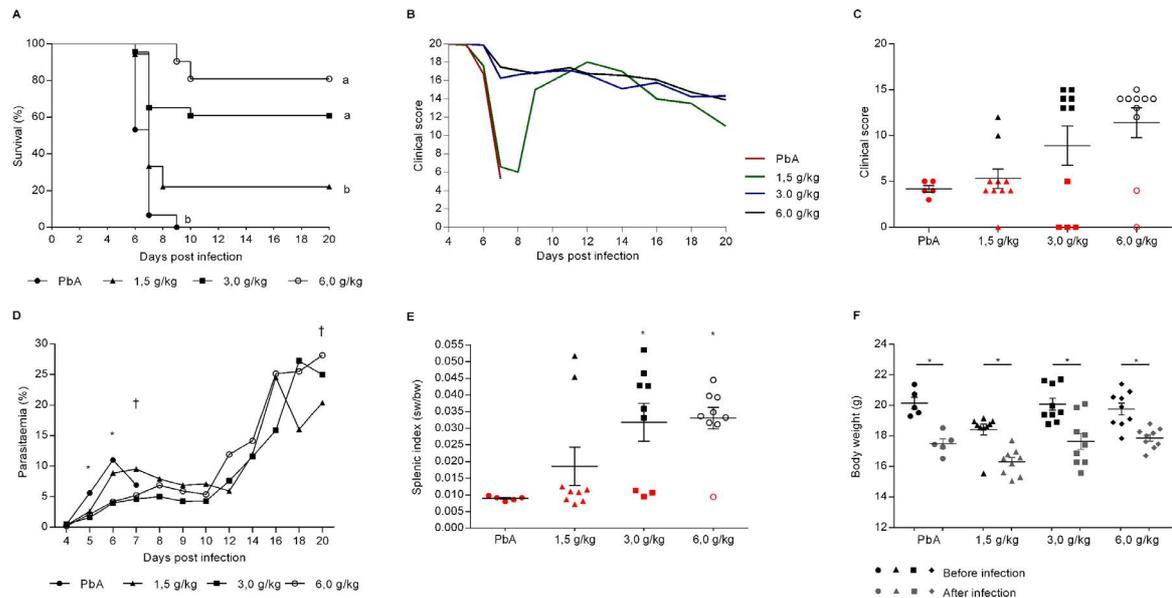
To determine the parasitemia levels, thin blood smears were made with a drop of blood collected from the tail vein and placed on a microscope slide. The smears were naturally dried, fixed with absolute methanol, and then stained with Giemsa. Parasitemia was determined by microscopic analysis considering the number of pRBCs within 1,000 counted erythrocytes.

### 2.3. Evaluation of blood-brain barrier leakage

Blood-brain barrier (BBB) damage occurs during CM, and can be evaluated in animals using the Evans blue permeability assay. Briefly, on the 7th dpi, mice were anaesthetized and a 2% Evans blue dye solution (Sigma-Aldrich) was injected intravenously (200  $\mu$ L/animal). After 45 min, mice were euthanized and then perfused with 10 mL of 1  $\times$  PBS. Brains were collected, photographed, and submerged in a formamide solution for 48 h at 37°C. The extravasated Evans blue dye was collected and the concentration was determined using a spectrophotometer at 620 nm [26]. The absorbance was normalized according to the brain tissue weight of each mouse.

### 2.4. Cerebral edema

Cerebral edema was determined as described by Promeneur and colleagues [27]. On the 7th dpi, mice were euthanized and the brains were carefully removed and immediately weighed to assess the wet weight (WW). The brains were then dried for 48 h at 60°C and weighed to assess the dry weight (DW). Brain water content was calculated as DW/WW. The results are presented as a ratio between the values obtained.



**Fig. 1.** Evaluation of clinical condition of *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice treated with DHA-rich fish oil. (A) Survival curve of treated and nontreated animals; (B) clinical assessment by the RMCBS over infection and (C) at the time of euthanasia. Red symbols in C indicate mice that developed cerebral malaria (CM) and were euthanized when the clinical score was under 5. (D) Frequency of parasitemia in infected animals. Crosses at days 7 and 20 indicate the two time-points at which parameters were evaluated. (E) Splenic index presented by animals at the time of euthanasia (spleen weight/body weight, sw/bw). Red symbols represent animals that were euthanized when the clinical score was under 5. (F) Body weight before and after infection. The results are representative of two independent experiments ( $n=9-10$  mice/group), and are shown as the mean  $\pm$  SEM. Different letters in A represent a significant difference between treated and nontreated groups. ( $P<.05$ ). \* indicates a significant difference between groups at  $P<.05$ . PbA: *Plasmodium berghei* ANKA.

### 2.5. Evaluation of pro- and anti-inflammatory cytokine levels

Cytokine levels (IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ) in the brain and serum were measured using the BD Cytometric Bead Array kits following the manufacturer's instructions (Becton, Dickinson and Company). Blood was collected by cardiac puncture and centrifuged at  $500 \times g$  for 10 minutes to obtain the serum. Brain tissue homogenate was obtained using a cytokine extraction solution (0.4 M NaCl, 0.05% Tween-20, 0.5% bovine serum albumin, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [Sigma-Aldrich], 0.1 mM benzethonium chloride [Sigma-Aldrich], 10 mM EDTA, 0.02% of aprotinin [Sigma-Aldrich]). Samples of brain homogenate and serum (50  $\mu$ L) were incubated with 50  $\mu$ L of a capture bead mix and 50  $\mu$ L of detection antibodies for 2 h. A wash buffer was then added and the samples were centrifuged at  $200 \times g$  for 5 min. Samples were acquired using a BD FACSCanto II cytometer (Becton, Dickinson and Company), and data were analyzed using FlowJo software (version 10.0).

### 2.6. Cellular profile analysis of the spleen

To analyze the cellular populations in the spleen, organs were collected on the 7th dpi, weighed, placed in RPMI medium with 10% fetal bovine serum (FBS), and kept on ice. Cells were collected by macerating the spleen through a 70  $\mu$ m cell strainer with 10 mL of RPMI medium with 10% FBS. The cells in suspension were centrifuged at  $400 \times g$  for 5 minutes at 4°C then the red blood cells were subsequently lysed with 5 mL of a lysis buffer (0.15 M ammonium chloride, 0.01 M potassium bicarbonate, 0.012 mM EDTA) for 4 minutes, after which 10 mL of RPMI medium with 10% FBS was added and the cell suspension was centrifuged at  $400 \times g$  for 5 minutes at 4°C. Next, the pellet was resuspended in RPMI-10% FBS and cell viability was verified by microscopic examination of an aliquot stained with Trypan blue (Sigma-Aldrich). The cell concentration was adjusted to  $10^6$  live cells/well in 96 "V" bottom plates

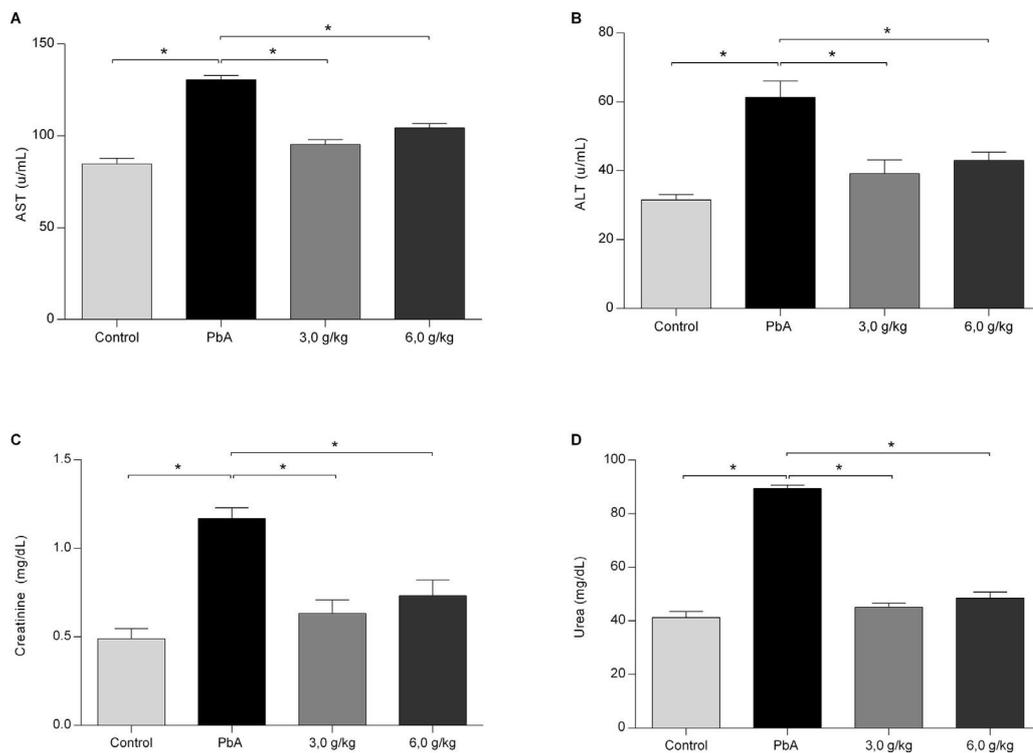
and the cells were incubated with a BV421 live/dead stain (Invitrogen) for 30 minutes. Cells were washed by adding 150  $\mu$ L of 5% FBS in  $1 \times$  PBS, and the plates were then centrifuged at  $400 \times g$  for 5 minutes at 4°C. Next, cells were incubated with 50  $\mu$ L of a pool of antibodies: PE anti-TCR (BD Pharmingen), AF700 anti-CD8 (BD Pharmingen), APC-H7 anti-CD4 (BD Pharmingen), PerCP-Cy5.5 anti-CD11b (BD Pharmingen), SB600 anti-Ly6G (eBioscience), APC-Cy7 anti-Ly6C (BD Pharmingen), and Fc block for 30 minutes at 4°C and protected from light. After a second wash, samples were resuspended in a staining buffer. Sample acquisition was carried out on a CytoFLEX cytometer (Becton, Dickinson and Company), and data were analyzed using FlowJo software (version 10.0) (Supplementary Fig. 1 and 2).

### 2.7. Histological analysis by light microscopy

Fixed brain slices (2/mice) were processed following routine histological procedures, embedded in paraffin, and cut into 5  $\mu$ m sections. The sections were stained with hematoxylin-eosin or toluidine blue. Images (10/section/animal;  $n=5$ ) were obtained with an Olympus BX53 light microscope and an Olympus DP73 camera using the CellSens software. To determine the frequency of hemorrhagic lesions, obstructed vessels, and the number of leukocytes adhered to endothelial capillaries, all obtained images were analyzed by an experienced pathologist.

### 2.8. Scanning electron microscopy analysis

Histological sections (5  $\mu$ m) on coverslips were dewaxed, dehydrated, and dried at room temperature. After drying, the samples were mounted on aluminum stubs and sprayed with gold for scanning electron microscope (SEM) analysis (Quanta 250, FEI Company).



**Fig. 2.** Evaluation of hepatic/renal function of *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice treated with DHA-rich fish oil. (A) Aspartate aminotransferase (AST) serum levels (U/mL); (B) alanine aminotransferase (ALT) serum levels (U/mL); (C) creatinine (mg/dL); and (D) urea (mg/dL) in serum collected on the 7th day postinfection. The results are representative of two independent experiments ( $n=5-6$  mice/group), and are shown as the mean  $\pm$  SEM. \*Indicates a significant difference between groups at  $P < .05$ . Control: noninfected and nontreated mice; PbA: *Plasmodium berghei* ANKA.

## 2.9. Biochemical and nitric oxide analysis

To evaluate the hepatic and renal functions, 50  $\mu$ L of serum collected on the 7th dpi were used to determine the levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine, and urea by commercial kits. The protocols were carried out as recommended by the manufacturer (LabTest Diagnostics). The levels of nitric oxide (NO) in the brain homogenate and serum were determined by the Griess reaction (Sigma-Aldrich). The concentration of NO was determined from a curve generated using a concentration series of a sodium nitrate standard solution.

## 2.10. Statistical analyses

Statistical analyses were performed in GraphPad Prism (GraphPad software, version 6.0). Normality tests were carried out to assess the distribution of the variables. If the distribution was parametric, a one-way analysis of variance (ANOVA) test was performed with a Tukey's test for multiple comparisons. If the distribution was not parametric, the Mann-Whitney U test was performed to compare the means between two groups. Survival data were plotted using the Kaplan-Meier method and statistical differences were evaluated using the log rank test. Values of  $P < .05$  were considered statistically significant.

## 3. Results

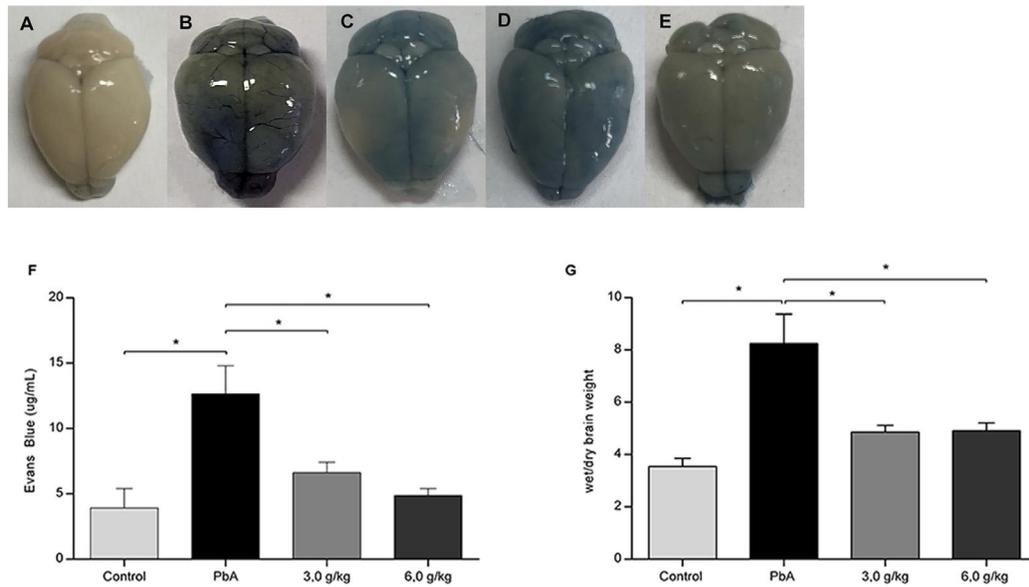
### 3.1. Effect of treatment with DHA-rich fish oil on the clinical score and survival of *P. berghei* ANKA-infected mice

Nontreated PbA-infected mice developed neurological symptoms, as indicated by inactivity, ataxia, body tremor, and loss of

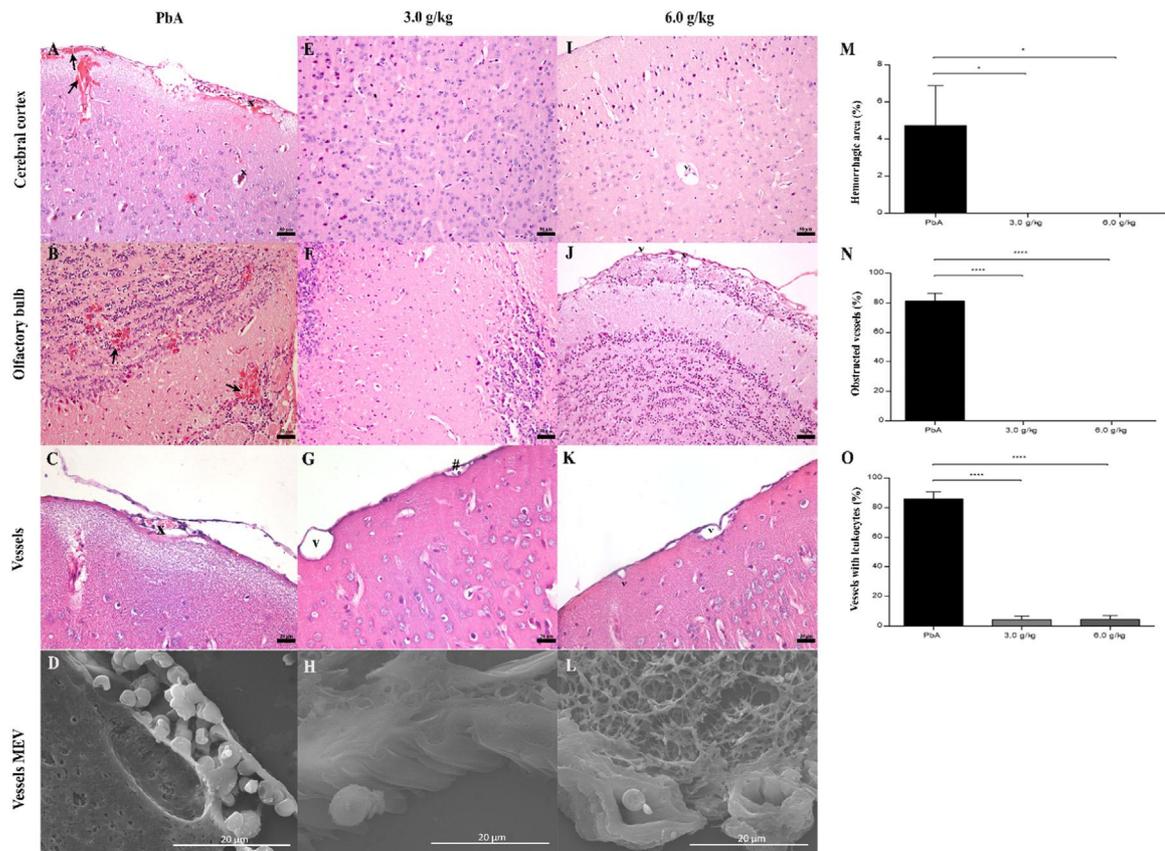
motor function. As a result, a 100% death rate occurred between the 6th and 8th dpi while treatment with the highest concentration of DHA significantly protected mice from developing CM. Specifically, 22%, 60%, and 81% of mice treated with 1.5, 3.0, or 6.0 g DHA/kg of body weight, respectively, survived the PbA infection until the 20th dpi without exhibiting any neurological symptoms (Fig. 1A-C), suggesting a dose-dependent protective effect of DHA.

### 3.2. Effect of treatment with DHA-rich fish oil on parasitemia, body weight, and hepatic/renal function of *P. berghei* ANKA-infected mice

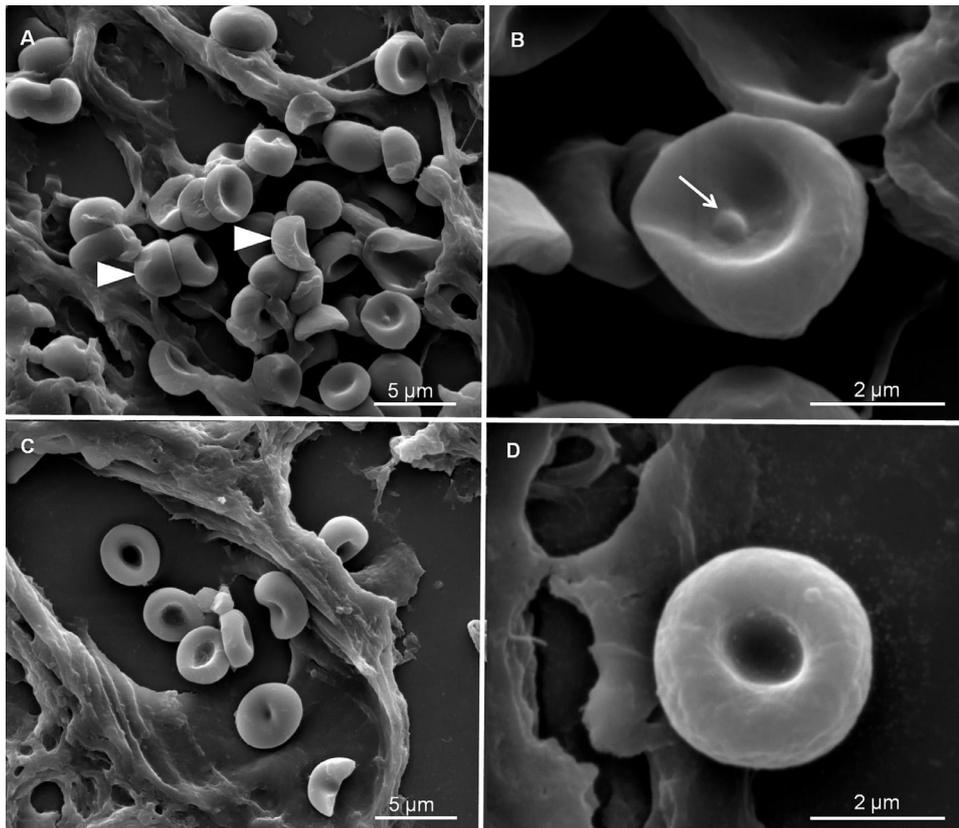
Mice from the nontreated PbA-infected group showed a significantly increased parasite load in the blood on the 5th and 6th dpi, particularly in relation to the groups treated with 3.0 and 6.0 g DHA/kg; while on the 6th dpi, the mean parasitemia of mice treated with 1.5 g DHA/kg was not significantly different from that of the PbA group. Regardless of the DHA dose, which was maintained throughout the study, the parasite load remained controlled ( $<10\%$ ) from the 7th dpi until the end of the critical period for CM (11th dpi), after which it progressively increased, reaching peaks  $>20\%$  on the last day of clinical evaluation (20th dpi). A dose-response effect of DHA treatment on parasitemia was not observed for the doses of 3.0 and 6.0 g DHA/kg, as the same effect on parasite load was observed in these treatment groups (Fig. 1D). It should also be noted that animals that developed high parasitemia had an enlarged spleen compared to those that were euthanized for having CM and also had low parasitemia (Fig. 1E). At the end of clinical assessment, DHA-treated animals still showed a significant loss of body weight (Fig. 1F), which was not observed before infection (between 0 to 15 days of treatment - Supplementary Figure 3). On the 7th dpi, the concentrations of AST, ALT, creatinine, and urea were found to be similar to those observed in the



**Fig. 3.** Evaluation of blood-brain barrier integrity and brain swelling of *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice treated with DHA-rich fish oil. On the 7th day postinfection, mice were anaesthetized, and an Evans blue dye solution was injected intravenously. Representative photographs of the brains from (A) mice that did not receive infection or treatment (Control); (B) nontreated PbA-infected mice; (C) mice treated with 3.0 g DHA/kg body weight and infected with PbA; and (D) mice treated with 6.0 g DHA/kg body weight and infected with PbA. (E) Evans blue concentration obtained from the brains. (F) Cerebral edema (wet weight/dry weight, WW/DW). The results are representative of two independent experiments ( $n=5-6$  mice/group), and are shown as the mean  $\pm$  SEM. \*Indicates a significant difference between groups at  $P<.05$ . PbA: *Plasmodium berghei* ANKA.



**Fig. 4.** Histopathological analysis of the brains from animals treated with DHA-rich fish following infection with *Plasmodium berghei* ANKA. The brains of mice were assessed on the 7th day postinfection. (A–D) Nontreated PbA-infected mice showed hemorrhagic areas, obstructed vessels, and leukocyte adherence. Mice treated with 3.0 (E–H) and 6.0 g DHA/kg body weight (I–L) and then infected with PbA had no hemorrhagic areas nor obstructed vessels in cerebral tissue, despite the presence of leukocytes in vessels. (M) Percentage of hemorrhagic areas. Results are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ /group). \*\*\*\*  $P<.001$ . (N) Percentage of obstructed vessels. Results are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ /group). \*\*\*\*  $P<.001$ . (O) Percentage of vessels with the presence of leukocytes ( $n=5$ /group). Results are shown as the mean  $\pm$  SEM. \*\*\*\*  $P<.001$ . (A, B, E, K, I, J): Microphotographs from a 20  $\times$  objective lens; scale bar 50  $\mu$ m; (C, F, G): microphotographs from a 40  $\times$  objective lens; scale bar 20  $\mu$ m; (D, H, L): scanning electron microscopy images; scale bar 20  $\mu$ m. Arrow: hemorrhagic areas; X: obstructed vessels; V: vessels without obstruction; PbA: *Plasmodium berghei* ANKA.



**Fig. 5.** Evaluation of conformational integrity of red blood cells from *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice treated with DHA-rich fish oil. Scanning electron microscopy images of red blood cells (RBCs) from (A and B) nontreated animals infected with PbA for 7 days, showing a shape change with biconcave conformation loss; and (C and D) from animals treated with 6.0 g DHA/kg body weight and infected with PbA for 7 days. Arrowhead: RBCs with concave shape. Arrow: Parasite.  $n=3$  mice/group.

nontreated, noninfected mice, and significantly lower to those observed in the nontreated PbA-infected mice (Fig. 2A–D).

### 3.3. Effect of treatment with DHA-rich fish oil on BBB disruption, edema, and other brain damage

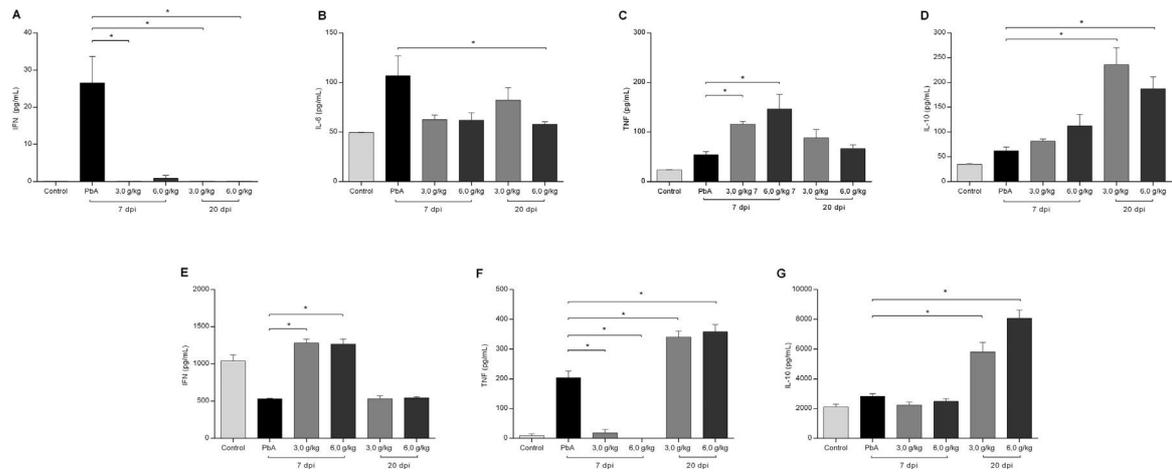
On the 7th dpi, mice of the PbA group showed intense Evans blue staining in the brain tissue (Fig. 3B) when compared to control (Fig. 3A) and infected mice treated with DHA at doses of 3.0 and 6.0 g/kg (Fig. 3C–D). Moreover, the concentration of Evans blue in the brain parenchyma of animals treated with 6.0 g DHA/kg was up to  $3 \times$  lower than the concentration observed in the brain of nontreated infected mice (Fig. 3E). Additionally, both tested concentrations of DHA significantly prevented the occurrence of brain edema, an important prognosis marker of severe infection (Fig. 3F).

DHA treatment at doses of 3.0 and 6.0 g/kg was also able to prevent hemorrhage and vascular occlusion. Vascular hemorrhage was observed in distinct brain areas of nontreated infected mice (Fig. 4A and B), and vascular occlusion, mediated by erythrocytes and leukocytes, was observed in superficial and deep blood vessels of the brain (Fig. 4C and D). On the other hand, none of these alterations were observed in the brains of DHA-treated mice (Fig. 4E–L). The frequency of hemorrhage, occluded vessels, and presence of leukocytes were significantly increased in the PbA group in comparison to those observed for the DHA-treated mice (Fig. 4M–O). Furthermore, a large number of erythrocytes in the brain vessels of nontreated infected mice lost the biconcave shape, instead assuming a concave shape (Fig. 5), including in the bloodstream (data not shown). These changes, however, were less notable in erythrocytes from DHA-treated mice.

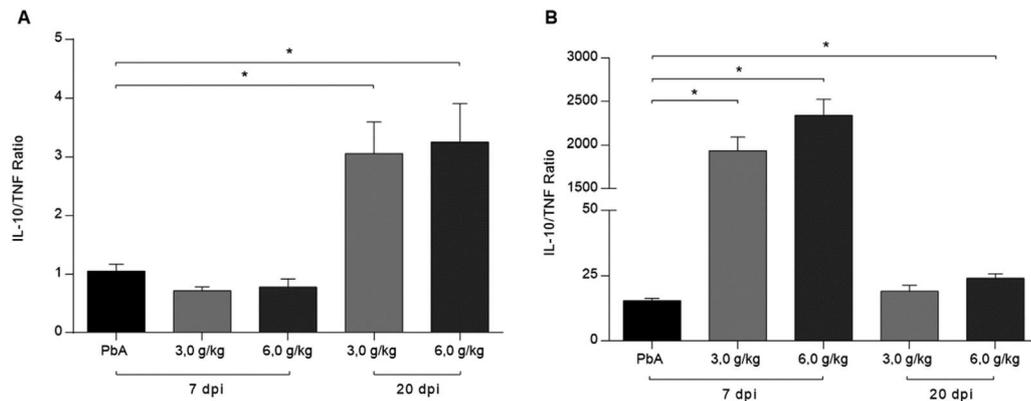
### 3.4. Effect of treatment with DHA-rich fish oil on the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine profile of infected mice

In relation to circulating cytokines, on the 7th dpi, IFN- $\gamma$  was not detected in DHA-treated mice, although it was detectable in the nontreated PbA-infected group (Fig. 6A). IFN- $\gamma$  was still not detectable by the 20th dpi in the DHA-treated groups. High levels of IL-6 were observed in the PbA group in comparison to treated animals on the 7th and 20th dpi (Fig. 6B). On the other hand, levels of TNF- $\alpha$  were significantly increased in treated mice on the 7th dpi when compared to those of the PbA group, although a reduction of levels was observed in the treated groups on the last day of the study (Fig. 6C). IL-10 levels were also higher on both days evaluated in DHA-treated animals in comparison to those of the nontreated infected mice (3.0 g DHA/kg:  $1.3 \times$  and  $3.8 \times$  on the 7th and 20th dpi, respectively; 6.0 g DHA/kg:  $1.8 \times$  and  $3.0 \times$  on the 7th and 20th dpi, respectively; Fig. 6D).

Cytokine levels were also investigated in the brain *in situ*. On the 7th dpi, the IFN- $\gamma$  levels were significantly increased in the DHA-treated mice in comparison with those of the PbA group; however, by the 20th dpi these levels were similar to those observed in the PbA group (Fig. 6E). On the other hand, TNF- $\alpha$  levels were significantly reduced in the DHA-treated mice on the 7th dpi compared to the levels seen in the PbA group, but by the 20th dpi, the levels in the treated mice treated were increased (Fig. 6F). Likewise, IL-10 levels were  $1.5 \times$  and  $2.8 \times$  higher for animals treated with 3.0 and 6.0 g DHA/kg, respectively, on the 20th dpi in comparison with the PbA group (Fig. 6G). When analyzing the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the serum and



**Fig. 6.** Assessment of cytokine levels in *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice treated with DHA-rich fish oil. (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-6, (C) TNF- $\alpha$ , and (D) IL-10 detected in the serum on the 7th and 20th after PbA infection. (E) IFN- $\gamma$  (F) TNF- $\alpha$ , and (G) IL-10 levels detected in the brain homogenate on the 7th and 20th after PbA infection. The results are representative of two independent experiments ( $n=5-6$  mice/group), and are shown as the mean  $\pm$  SEM. \*Indicates a significant difference between groups at  $P<.05$ . dpi: days postinfection; Control: noninfected and nontreated mice; PbA: *Plasmodium berghei* ANKA.



**Fig. 7.** Anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice treated with DHA-rich fish oil. IL-10/TNF- $\alpha$  ratio in (A) the serum and (B) brain homogenate. \*Indicates a significant difference between groups at  $P<.05$ . dpi: days postinfection; PbA: *Plasmodium berghei* ANKA.

brain homogenate on the 7th and 20th dpi for treated and nontreated animals, it was possible to observe an anti-inflammatory profile in the serum only in treated mice at day 20 (Fig. 7A). In contrast, an anti-inflammatory profile in the brain was only observed in treated mice on day 7 (Fig. 7B). IL-2, IL-4, and IL-17 levels were not detectable from any samples tested (data not shown).

On the 7th dpi, mice receiving 6.0 g DHA/kg exhibited reduced NO levels in the circulation compared to all the other groups (Fig. 8A), while in the brain, the NO level was significantly increased (Fig. 8B). However, on the 20th dpi, which is after the critical period for CM development, NO levels in the brains of mice from the 6.0 g DHA/kg group were reduced and were not significantly different from those observed in the control, PbA, and 3.0 g DHA/kg groups (Fig. 8B).

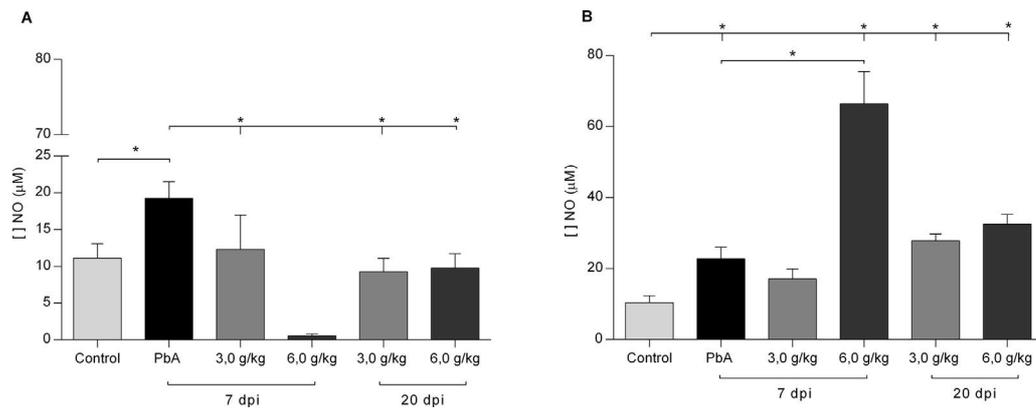
### 3.5. Effect of treatment with DHA-rich fish oil on the phenotypic profile of cells in the spleens of mice

There was an increase in the number of cells expressing the CD11b marker, as well as an elevated number of inflammatory monocytes (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup>Ly6G<sup>-</sup>) and neutrophils (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>), in animals treated with 3.0 g and 6.0 g DHA/kg (Fig. 9A–C). There was no difference in the number of lymphoid cells between the groups (Fig. 9D–E). However, the number

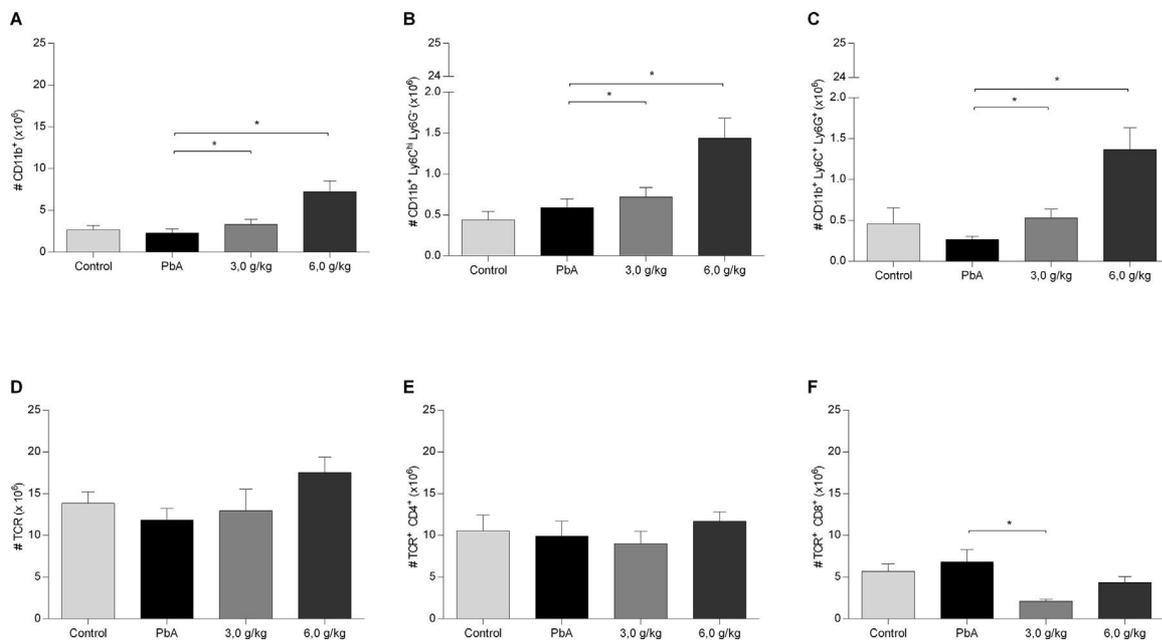
of CD8 T cells (TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) was reduced in animals treated with 3.0 and 6.0 g DHA/kg compared to that observed in nontreated PbA-infected mice (Fig. 9F).

## 4. Discussion

In this study, the treatment with DHA-rich fish oil significantly protected mice from CM caused by PbA, with a DHA dose-dependent effect. This protection may be associated with the antiparasitic effect of the treatment in the first days of infection (5th and 6th dpi) and with the control of parasite load observed on the following days (7th to 10th dpi), which are within the critical time for CM development. Indeed, several studies have already shown that dietary supplementation with fish oil is able to suppress the multiplication of *P. yoelii* and *P. berghei* *in vivo* [23,28–30], and that this effect may occur in the absence [28,31,32] or presence [30] of antioxidants, such as vitamin E. Thus, it is possible that the control of blood parasitemia by the action of DHA reduced, consequently, the accumulation of parasites and leukocytes in the cerebral capillaries, preventing the occurrence of hemorrhages and vascular obstructions, as was observed in this study. DHA may have also modified the profile of eicosanoids involved in the inflammatory process, and consequently influenced the expression of adhesion molecules for erythrocytes and leukocytes, such



**Fig. 8.** Determination of nitric oxide levels in *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice treated with DHA-rich fish oil. NO levels in (A) the serum and (B) brain homogenate. The results are representative of two independent experiments ( $n=5-6$  mice/group), and are shown as the mean  $\pm$  SEM. \*Indicates a significant difference between groups at  $P<.05$ . dpi: days postinfection; Control: noninfected and nontreated mice; PbA: *Plasmodium berghei* ANKA.



**Fig. 9.** Splenic cell populations of *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice treated with DHA-rich fish oil. Number of (A) myeloid cells (CD11b<sup>+</sup>), (B) inflammatory monocytes (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup>Ly6G<sup>-</sup>), (C) neutrophils (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup>Ly6G<sup>+</sup>), (D) lymphoid cells (TCR<sup>+</sup>), (E) TCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells, and (F) TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells from the spleens on the 7th day after PbA infection. The number of cells expressing the specific receptor/10<sup>6</sup> cells are shown, and the results are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n=5-6$  mice/group). \*Indicates a significant difference between groups at  $P<.05$ . PbA: Control: noninfected and nontreated mice; *Plasmodium berghei* ANKA.

as intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1), resulting in lower CM-related mortality [14]. However, the loss of parasitemia control after the 11th dpi is intriguing, since all animals were kept under the DHA treatment until the end of the study.

Before the experimental infection, the treatment with DHA did not affect the body weight of animals, which is not surprising since previous studies did not show any association between dietary supplementation with fish oil and weight gain [33,34]. Specifically, the use of fish oil appears to increase thermogenesis through the induction of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) in adipocytes, which then begin to accumulate less fat. Furthermore, fish oil appears to reduce the proliferation of fat cells. Animals from all infected groups exhibited significant weight loss that may be associated with the inability to eat properly or with dehydration, a reflection of inflammation and weakness resulting from possible anemia owing to high parasitemia and other factors [35].

The analysis of the Evans blue concentration in brain tissue revealed that nontreated infected animals had greater BBB permeability compared to that of DHA-treated mice, resulting in brain edema. These data are important since edema is considered to have the worst prognosis in pediatric CM [36–38], as well as in murine CM [39]. In the murine model, edema appears to be induced by action of CD8<sup>+</sup> T cells on vascular endothelium or brain parenchyma [40,41], while in humans no cytokine/inflammatory mediator has been associated with this prognosis [42]. According to previous studies, DHA protects the BBB from damage by the production of neuroprotectin D1 (NPD1), a cerebral molecule that regulates the pro-inflammatory response [43–46].

Regarding the serological profile of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, in contrast to the high IFN- $\gamma$  and IL-6 levels observed in the nontreated PbA group, the absence and low levels of these cytokines, respectively, were detected in animals treated with 3.0 and 6.0 g DHA/kg during the follow-up

after infection. Furthermore, on the 7th and 20th dpi, infected animals from treated groups had TNF- $\alpha$  levels higher or similar to those observed in the nontreated PbA group. IFN- $\gamma$  neutralization or depletion of its receptors *in vivo* have been correlated with protection against CM [47,48]. Likewise, elevated serological levels of IL-6 have been associated with human cases of severe malaria, including CM in children and adults [49–51]. Although the serological levels of TNF- $\alpha$  observed in this study were not clearly associated with the severe malaria, literature data suggest that high serological levels of this cytokine can be positively correlated with the development of murine CM [47,52]. In humans, the data are contradictory with elevated levels found in people who died from CM [50] or not discriminating between cerebral and uncomplicated malaria [53]. In the same way, the occurrence of CM in TNF-knockout mice and the observation that treatment with anti-TNF monoclonal antibody did not improve the survival rate of Gambian children with this syndrome [54] lead to questions about the real role of this cytokine in malaria pathogenesis. IL-10 was also elevated, especially in treated animals on the 20th dpi. Plasmatic IL-10 has been associated with protection against CM in a murine model [47,55] and in humans [56,57], although high circulating levels are also associated with severe cases of the human disease [49,58]. The mechanism by which IL-10 appears to protect against CM is associated with its ability to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  [47]. In any case, there is a consensus that the determination of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine levels and their association with CM may be more relevant when determined *in situ* (brain) than in the circulation [47]. In this sense, the analysis of the ratio between pro-inflammatory (TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines detected in the brain tissue demonstrated a strong predominance of an anti-inflammatory profile in treated mice, especially on the 7th dpi, a critical day for CM development. Thus, as mentioned earlier, it is possible that the treatment with DHA reduces the expression of adhesion molecules in cerebral tissue [59], as a consequence of a lower induction of pro-inflammatory cytokines. Although in malarial infections the production of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, and IL-6, seem essential at the beginning of the symptomatic phase of the disease, their reduction after this initial period, with increased TGF- $\beta$  and IL-10 levels, appears to be important for maintenance of noncomplicated status of disease [49].

Regarding NO, the serological levels were significantly increased in the nontreated PbA group in comparison with those of the DHA-treated groups. This could explain, at least in part, the accentuated alteration of the biconcave shape of erythrocytes in nontreated mice when compared to those of the DHA-treated mice. Oxidative stress has been described as an important mechanism in erythrocyte lipid bilayer damage, as it can affect the function of important enzymes responsible for the maintenance of normal lipid composition and organization [60]. During the *Plasmodium* lifecycle, large amounts of hemozoin and heme, potent inducers of oxidative stress, are released into the bloodstream from erythrocyte lysis. The oxidative stress event is potentiated by reactive oxygen species (ROS) and NO produced in response to these metabolites. Therefore, infected and noninfected red blood cells are under conditions of lipid peroxidation and oxidative stress [61,62]. As  $\Omega$ -3 PUFAs, including DHA, have been reported to limit oxidative stress, it is possible that maintenance of erythrocyte shape is, at least in part, associated to the control of this event at the same time that oxidized lipids are rapidly repaired using fatty acids taken up from plasma, as previously suggested [60]. Of course, the intra-erythrocytic development of the parasites causes alterations to the cellular architecture, affecting several important cell properties, such as flexi-

bility and adherence, which contribute to the pathophysiology of severe malaria [63].

In the same way, it is intriguing that on the 7th dpi, significantly increased levels of NO were detected only in the brain tissue of animals treated with 6.0 g DHA/kg when compared to the other groups (untreated and 3.0 g DHA/kg-treated infected mice). It remains to be investigated whether the detectable NO in the brain tissue of these treated animals contributes to protection against CM. However, the prophylactic use of inhaled NO was reported to prevent the development of CM caused by PbA [64]. Furthermore, Gramaglia and colleagues (2006) demonstrated that reduced bioavailability of NO positively contributes to neurological injuries [65]. Likewise, among children who died of CM, NO levels were reduced in the circulation [66]. NO is produced by a family of nitric oxide synthase (NOS) enzymes that catalyze the production of NO from L-arginine, and is a gaseous signaling molecule that plays an important role in regulating endothelial function [58,67]. The immune mechanisms involving NO include vasodilatation, inhibition of inflammatory responses, reduction in the expression of cell adhesion molecules on the endothelium, and limiting intravascular platelet and leukocyte aggregation [68,69,70]. Therefore, studies are needed to determine whether the dietary supplementation with PUFAs can increase the bioavailability of NO in malarial infections and help to prevent severe conditions.

Considering that a balanced immune system is essential for the protection against pathogens [71], and that nutrients, such as fatty acids, are crucial for the immune system regulatory properties [72], the relationship between DHA, CM, and splenic profile of different cell populations was investigated. Neutrophils and inflammatory monocytes were found in greater frequency in the spleens of animals that received DHA at a dose of 6.0 g/kg. Neutrophils are the first cell type attracted to the local of inflammation, actively participating in the infection control [73] by different mechanisms [71]. Previous studies have shown that  $\Omega$ -3 PUFAs can be incorporated into the phospholipids of the neutrophil membrane and then metabolized into substances, such as maresins, protectins, and resolvins [71,74], which are known to be protective against different infections. Although some studies have suggested that such molecules lead to inhibition of neutrophil migration [71], a recent study suggested that a diet rich in PUFAs can increase the migration of these cells from the circulation to the spleen via cytokine production, even delaying cell death [75]. In addition,  $\Omega$ -3 PUFAs, more specifically DHA, appear to increase the phagocytic ability of neutrophils, both *in vitro* and *in vivo* [76,77], which may contribute to the control of different infections. These cells were also recently described as a potential source of IL-10 in cattle [78], mice [79,80], and humans [81] under certain inflammatory conditions. During *Trypanosoma cruzi* infection, neutrophil depletion in mice was shown to lead to greater infection severity [80]. However, there is evidence that IL-10 produced by anti-inflammatory neutrophils is capable of inhibiting the production of a series of pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-6 by monocytes/macrophages [81,82]. Therefore, neutrophils are important in the control of infectious parasitic diseases and are even capable of producing neutrophil extracellular traps (NETs) [83]. Whether treatment with DHA triggers NET formation and other neutrophilic functions during malarial infection is yet to be investigated.

The DHA treatment also reduced the frequency of splenic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during PbA infection. Our data differ from those of Monk and colleagues, who suggested that  $\Omega$ -3 PUFAs induce an increase in CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells in the murine spleen [84]; while Svahn and colleagues (2019) did not observe any alteration of the splenic cell profile associated with a diet rich in PUFAs [75]. The cytotoxic function by CD8<sup>+</sup> T cells on the BBB, promoting its rupture, combined with the infiltration and sequestration of PbA-

infected erythrocytes and leukocytes into the brain parenchyma, appear to be critical events for the development of CM [41,84–86]. Cytotoxic molecules, such as granzymes and perforin, secreted by CD8<sup>+</sup> T cells can contribute to brain injuries [40,87,88]. Corroborating studies carried out in murine models, the accumulation of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the brains of Malawi children who died of CM was also recently described [89,90]. Therefore, therapies targeting CD8<sup>+</sup> T cells may, in the future, help to prevent or reverse CM.

In summary, our data suggest that dietary supplementation with DHA may be a good alternative in areas with a high prevalence of CM, reducing the risk of this severe disease and death. However, it should be noted that the doses  $\Omega$ -3 PUFAs used in this study and others [91–93] are incompatible for application in humans. Therefore, it is necessary to investigate whether similar results would also be obtained with lower doses of DHA, and/or when used for an extended time.

In conclusion, we provide new evidence that DHA-rich fish oil intake prevented the development of severe malaria in a murine model, with focus on CM, by controlling inflammatory and mechanical events associated with the infection.

#### Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this article.

#### Author contributions

BAC performed and acquired all the experimental data and designed the experimental protocol. DCR, JCB, CDV, CMR, MVRF and AFSN provided technical support for all experiments. VNR did the microscopic analyses; CSF and EAFC carried out the biochemical analyses; FLRG supervised the cell phenotyping assay and analyzed the cytometry data; KKGS obtained the funding, designed the experimental protocol and supervised the studies. BAC, VNR, BSM, FLRG and KKGS wrote the manuscript. All authors contributed to the final writing of the manuscript.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jnutbio.2023.109492.

#### References

- [1] World malaria report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [2] Storm J, Jespersen JS, Seydel KB, Szestak T, Mbewe M, Chisala NV, et al. Cerebral malaria is associated with differential cytoadherence to brain endothelial cells. *EMBO Mol Med* 2019;11(2):1–15. doi:10.15252/emmm.201809164.
- [3] Storm J, Craig AG. Pathogenesis of cerebral malaria-inflammation and cytoadherence. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4:100. doi:10.3389/fcimb.2014.00100/BIBTEX.
- [4] Berendt AR, Tumer GDH, Newbold CI. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. *Parasitol Today* 1994;10(10):412–14. doi:10.1016/0169-4758(94)90238-0.
- [5] Sierro F, Grau GER. The ins and outs of cerebral malaria pathogenesis: immunopathology, extracellular vesicles, immunometabolism, and trained immunity. *Front Immunol* 2019;10(MAR):1–11. doi:10.3389/fimmu.2019.00830.
- [6] Clark IA, Rockett KA. The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitol Today* 1994;10(10):410–12. doi:10.1016/0169-4758(94)90237-2.
- [7] Bruneel F. Human cerebral malaria: 2019 mini review. *Rev Neurol (Paris)* 2019;175(7–8):445–50. doi:10.1016/j.neurol.2019.07.008.
- [8] World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [9] Brim R, Mbona S, Semrud-Clikeman M, Kampondeni S, Magen J, Taylor T, et al. Cognitive outcomes and psychiatric symptoms of retinopathy-positive cerebral malaria: Cohort description and baseline results. *Am J Trop Med Hyg* 2017;97(1):225–31. doi:10.4269/ajtmh.17-0020.
- [10] Boivin MJ, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM, et al. Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics* 2007;119(2). doi:10.1542/peds.2006-2027.
- [11] Idro R, Jenkins NE, Newton CRJ. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol* 2005;4(12):827–40. doi:10.1016/S1474-4422(05)70247-7.
- [12] Varo R, Erice C, Johson S, Bassat Q, Kain KC. Clinical trials to assess adjunctive therapeutics for severe malaria. *Malar J* 2020;19(268):1–6. doi:10.1186/S12936-020-03340-3.
- [13] John CC, Kutumba E, Mugarura K, Opoka RO. Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of *Plasmodium falciparum* malaria. *Natl Inst Health* 2010;8(9):997–1008. doi:10.1586/eri.10.90.Adjunctive.
- [14] Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans* 2017;45:1105–15.
- [15] Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *IUBMB Life* 2015;67(9):659–67.
- [16] Sun GY, Fritsche KL, Chuang DY, Hannink K, Gu Z, et al. Docosahexaenoic acid (DHA): an essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2018;136:3–13. doi:10.1016/j.plefa.2017.03.006.
- [17] Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Adv Nutr* 2012;3(1):1–7. doi:10.3945/an.111.000893.
- [18] Puskás LG, Kitayka K, Nyakas C, Barcelo-Coblijn B, Farkas T. Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(4):1580. doi:10.1073/PNAS.0337683100.
- [19] Zuo G, Zhang D, Mu R, Shen H, Li X, Wang Z, et al. Resolvin D2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Molecular Brain* 2018;11(9):1–13. doi:10.1186/s13041-018-0351-1.
- [20] Braz-De-Melo HA, Pasquali-Nascimento G, Correa R, Almeida RN, Santos IO, Prado PS, et al. Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. *Sci Rep* 2019;9(1):1–12. doi:10.1038/s41598-019-56556-y.
- [21] Horta AL, Williams T, Han B, Ma Y, Menezes APJ, Tu V, et al. Resolvin D1 administration is beneficial in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 2020;88(6):e00052–20. doi:10.1128/IAI.00052-20.
- [22] Malta-Santos H, Andrade BB, Zanette DL, Costa JN, Bozza PT, Bandeira-Melo C, et al. Resolvin D1 drives establishment of *Leishmania amazonensis* infection. *Sci Rep* 2017;10:46363. doi:10.1038/srep46363.
- [23] Melarini P, Campbell W, Etusim P, Smith P. In vitro and in vivo antimicrobial activity of linolenic and linoleic acids and their methyl esters. *Adv Stud Biol* 2012;4(7):333–49.
- [24] Blok WL, ogels MTE, Curfs JHAJ, Eling WMC, Buurman WA, van der Meer JWM. Dietary fish-oil supplementation in experimental gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. *J Infect Dis* 1992;165(5):898–903. doi:10.1093/infdis/165.5.898.
- [25] Carroll RW, Wainwright MS, Kim K-T, Kidambit T, Gomez T, et al. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS One* 2010;5(10):1–12. doi:10.1371/journal.pone.0013124.
- [26] Dende C, Meena J, Nagarajan P, Panda AK, Rangarajan PN, Padmanaban G. Simultaneously targeting inflammatory response and parasite sequestration in brain to treat Experimental Cerebral Malaria. *Sci Rep* 2015;5:1–14. doi:10.1038/srep12671.
- [27] Promeneur D, Lund LK, Amiry-Moghaddam M, Agre P. Protective role of brain water channel AQP4 in murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci* 2013;10(3):1035–40. doi:10.1073/pnas.1220566110.
- [28] Fevang P, Sääv H, Høstmark AT. Dietary fish oils and long-term malaria protection in mice. *Lipids* 1995;30(5):437–41. doi:10.1007/BF02536302.
- [29] Levander OA, Ager AL Jr, Morris VC, May RG. Qinghaosu, dietary vitamin E, selenium, and cod-liver oil: Effect on the susceptibility of mice to the malarial parasite *Plasmodium yoelii*. *Am J Clin Nutr* 1989;50(2):346–52. doi:10.1093/ajcn/50.2.346.
- [30] Fujikawa M, Kamitani T, Tunru IS, Yamazaki T, Hamazaki T. Antimalarial effects of purified and  $\alpha$ -tocopherol-Fortified n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 1993;4(3):153–7. doi:10.1016/0955-2863(93)90043-V.
- [31] Taylor DW, Levander AO, Krishna VR, Evans CB, Morris VC, Barta JR. Vitamin E-deficient diets enriched with fish oil suppress lethal *Plasmodium yoelii* infections in athymic and scid/bg mice. *Infect Immun* 1997;65(1):197–202. doi:10.1128/iai.65.1.197-202.1997.
- [32] Kumaratilake LM, Robinson BS, Ferrante A, Poulos A. Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: in vitro effects on *Plasmodium falciparum* and in vivo effects on *P. berghei*. *J Clin Invest* 1992;89:961–7.
- [33] Kim M, Goto T, Yu R, Uchida K, Tominaga M, Kano Y, et al. Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Sci Rep* 2015;5:1–12. doi:10.1038/srep18013.

- [34] Puglisi MJ, et al. The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil. *J Nutr Biochem* 2011;22:101–8. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.07.003.
- [35] Ataide Bjde A, Kauffmann N, Mendes NSF, Torres MLM, Anjos LM, Passos A.C.F., et al. Melatonin prevents brain damage and neurocognitive impairment induced by *Plasmodium berghei* ANKA infection in murine model of cerebral malaria. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:1–12. doi:10.3389/fcimb.2020.541624.
- [36] Kampondeni SD, Birbeck GL, Seydel KB, Beare NA, Glover SJ, Hammond C.A., et al. Noninvasive measures of brain edema predict outcome in pediatric cerebral malaria. *Surg Neurol Int* 2018;9(5(3)):1–7. doi:10.4103/sni.sni\_297\_17.
- [37] Seydel KB, Kampondeni SD, Valim C, Potchen MJ, Milner DA, Muwabo FW, et al. Brain swelling and death in children with cerebral malaria. *N Engl J Med* 2015;372(12):1126–37. doi:10.1056/nejmoa1400116.
- [38] Newton CRJC, Peshu NP, Kendall B, Kirkhan FJ, Sowunmi A, Waruiru C, et al. Brain swelling and ischaemia in Kenyans with cerebral malaria. *Arch Dis Child* 1994;70(4):281–7. doi:10.1136/adc.70.4.281.
- [39] Penet MF, Viola A, Confort-Gouny S, Fur YL, Duhamel G, Kober F, et al. Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci* 2005;25(32):7352–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.1002-05.2005.
- [40] Huggins M, Johnson HL, Jin F, Songo AN, Hanson LM, LaFrance SJ, et al. Perforin expression by CD8 T cells is sufficient to cause fatal brain edema during experimental cerebral malaria. *Infect Immun* 2017;85(5):1–12. doi:10.1128/IAI.00985-16.
- [41] Chang WL, Jones SP, Lefer DJ, Welbourne T, Sun G, Yin L, et al. CD8+T-cell depletion ameliorates circulatory shock in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Infect Immun* 2001;69(12):7341–8. doi:10.1128/IAI.69.12.7341-7348.2001.
- [42] Harawa V, Njie M, Kessler A, Choko A, Kumwenda B, Kampondeni S, et al. Brain swelling is independent of peripheral plasma cytokine levels in Malawian children with cerebral malaria. *Malar J* 2018;17(1):1–11. doi:10.1186/s12936-018-2590-0.
- [43] Hong SH, Khoutorova L, Bazan NG, Belayev L. Docosahexaenoic acid improves behavior and attenuates blood-brain barrier injury induced by focal cerebral ischemia in rats. *Exp Transl Stroke Med* 2015;7(1):1–10. doi:10.1186/s13231-014-0012-0.
- [44] Pan HC, Pan HC, Kao TK, Ou YC, Yang DY, Yen YJ, et al. Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats. *J Nutr Biochem* 2009;20(9):715–25. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.06.014.
- [45] Bazan NG. Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2005;32(1):89–103. doi:10.1385/mn:32:1:089.
- [46] Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, et al. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 2003;278(44):43807–17. doi:10.1074/jbc.M305841200.
- [47] Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 2003;24(9):491–9. doi:10.1016/S1471-4906(03)00229-1.
- [48] Amani V, Vigarito AM, Belnoue E, Marussig M, Fonseca L, Mazier D, et al. Involvement of IFN- $\gamma$  receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol* 2000;30(6):1646–55. doi:10.1002/1521-4141(200006)30:6<1646::AID-IMMU1646>3.0.CO;2-0.
- [49] Mandala WL, Msefula CL, Gondwe EN, Drayson MT, Molyneux MA, MacLennan CA. Cytokine profiles in Malawian children presenting with uncomplicated malaria. *Clin Vaccine Immunol* 2017;24(4):1–11. doi:10.1128/CVI.00533-16.
- [50] Dieye Y, Mbengue B, Dagamajalu S, Fall MM, Loke mF, Nguer CM, et al. Cytokine response during non-cerebral and cerebral malaria: evidence of a failure to control inflammation as a cause of death in African adults. *PeerJ* 2016;2016(5):1–20. doi:10.7717/peerj.1965.
- [51] Lyke KE, Burgues R, Cissoto Y, Sangaré L, Dao M, Diarra I, et al. Serum levels of the pro-inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun* 2004;72(10):5630–7. doi:10.1128/IAI.72.10.5630-5637.2004.
- [52] Grau GE, Farjado LF, Piguat PF, Allet B, Lambert PH, Vassalli P. Tumor necrosis factor as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987;237(9):1210–12. doi:10.1126/science.3306918.
- [53] Lovegrove FE, Gharib SA, Pena-Catillo L, Patel SN, Ruzinski JT, Hughes TR, et al. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. *PLoS Pathog* 2009;4(5):e1000068. doi:10.1371/journal.ppat.1000068.
- [54] Van Hensbroek MB, Palmer A, Onyieorah E, Schneider G, Jaffar S, Dolan G, et al. The effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria. *J Infect Dis* 1996;174(5):1091–7. doi:10.1093/infdis/174.5.1091.
- [55] Kossodo S, Monso C, Juillard P, Velu T, Goldmann M, Grau GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology* 1997;91:536–40. doi:10.1046/j.1365-2567.1997.00290.x.
- [56] Day NPJ, Day N, Hien T, Schollaardt T, Loc PP, Chuong L, et al. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and anti-inflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis* 1999;180(4):1288–97. doi:10.1086/315016.
- [57] Kurtzhals JAL, Akanmori BD, Goka BQ, Adabayeri V, Nkrumah FK, Behr C, et al. The cytokine balance in severe malarial anemia. *J Infect Dis* 1999;180(5):1753–5. doi:10.1086/315077.
- [58] Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave P, Mishra G, Pied S. Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of central India. *J Infect Dis* 2006;194(2):198–207. doi:10.1086/504720.
- [59] Lin Y, Xu M, Wan J, Wen S, Su J, Zhao H, et al. Docosahexaenoic acid attenuates hyperglycemia-enhanced haemorrhagic transformation after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 2015;301:471–9. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.06.024.
- [60] Kuypers SFA. Membrane lipid alterations in hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;2007(1):68–73. doi:10.1182/asheducation.
- [61] Percário S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves ACM, Laurindo PSOC, et al. Oxidative stress in Malaria. *Int J Mol Sci* 2012;13(12):16346–72. doi:10.3390/ijms131216346.
- [62] Das BS, Nanda NK. Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93(1):58–62. doi:10.1016/S0035-9203(99)90180-3.
- [63] Neveu G, Lavazec C. Erythrocyte membrane makeover by *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Front Microbiol* 2019;10:1–8. doi:10.3389/fmicb.2019.02652.
- [64] Serghides L, Kim H, Lu Z, Kain DC, Miller C, Francis RC, et al. Inhaled nitric oxide reduces endothelial activation and parasite accumulation in the brain, and enhances survival in experimental cerebral malaria. *PLoS One* 2011;6(11):e27714. doi:10.1371/journal.pone.0027714.
- [65] Gramaglia I, Sobolewski P, Meays D, Contreras R, Nolan JP, Frangos JA, et al. Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* 2006;12(12):1417–22. doi:10.1038/nm1499.
- [66] Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, et al. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med* 1996;184(2):557–67. doi:10.1084/jem.184.2.557.
- [67] Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, Roberts DD. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat Rev Cancer* 2009;9(3):182–94. doi:10.1038/nrc2561.
- [68] Liu X, Huang Y, Pokreisz P, Vermeersch P, Marsboom G, Swinnen M, et al. Nitric oxide inhalation improves microvascular flow and decreases infarction size after myocardial ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(8):808–17. doi:10.1016/j.jacc.2007.04.069.
- [69] Seriom S, Rahaarjo WH, Chotivanich K, Loareesuwan S, Kubes P, Ho M. Anti-adhesive effect of nitric oxide on *Plasmodium falciparum* cytoadherence under flow. *Am J Pathol* 2003;162(5):1651–60. doi:10.1016/S0002-9440(10)64299-X.
- [70] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response: nature immunology. *Nat Immunol* 2001;2(10):907–16.
- [71] Gutiérrez S, Svahn SL, Johansson ME. Effects of omega-3 fatty acids on immune cells. *Int J Mol Sci* 2019;20(20):5028. doi:10.3390/ijms20205028.
- [72] Wu D, Meydani SN. N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Proc Nutr Soc* 1998;57(1998):503–9. doi:10.1016/S0065-2571(96)00004-0.
- [73] Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013;13(3):159–75. doi:10.1038/nri33399.
- [74] Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7(2):1–20. doi:10.1101/cshperspect.a016311.
- [75] Svahn SL, Gutiérrez S, Ulleryd MA, Nookaew I, Osla V, Beckman F, et al. Dietary polyunsaturated fatty acids promote neutrophil accumulation in the spleen by altering chemotaxis and delaying cell death. *Infect Immun* 2019;87(8):1–14. doi:10.1128/IAI.00270-19.
- [76] Paschoal VA, Vinolo MAR, Crisma AR, Magdalon J, Curi R. Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid differentially modulate rat neutrophil function in vitro. *Lipids* 2013;48(2):93–103. doi:10.1007/s11745-012-3726-6.
- [77] Gorjão R, Verlengia R, Lima TM, Soriano FG, Boaventura MFC, Kanunfre CC, et al. Effect of docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on human leukocyte function. *Clin Nutr* 2006;25(6):923–38. doi:10.1016/j.clnu.2006.03.004.
- [78] Li L, Si H, Wu S-W, Mendez JO, Zarlega D, Tuo W, et al. Characterization of IL-10-producing neutrophils in cattle infected with *Ostertagia ostertagi*. *Sci Rep* 2019;9(1):1–14. doi:10.1038/s41598-019-56824-x.
- [79] González LA, Melo-González F, Sebastian VP, Vallejos OP, Noguera LP, Suazo ID, et al. Characterization of the anti-inflammatory capacity of IL-10-producing neutrophils in response to streptococcus pneumoniae infection. *Front Immunol* 2021;12(April):1–16. doi:10.3389/fimmu.2021.638917.
- [80] Boari JT, Valesy MCA, Bermejo DA, Ramello MC, Cejas H, et al. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathog* 2012;8(4):e1002658. doi:10.1371/journal.ppat.1002658.
- [81] Lewkowicz N, Mycko MP, Przygodzka P, Cwiklińska H, Cichalewska M, Matysiak M, et al. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunol* 2016;9(2):364–78. doi:10.1038/mi.2015.66.
- [82] Perobelli SM, Galvani RG, Gonçalves-Silva T, Xavier CR, Nóbrega A, Bonomo A. Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Braz J Med Biol Res* 2015;48(8):665–75. doi:10.1590/1414-431X20154524.
- [83] Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol* 2018;9:1–17. doi:10.3389/fphys.2018.00113.
- [84] Monk JM, Hou TY, Turk HF, McMurray DN, Chapkin RS. n3 PUFAs re-

- duce mouse CD4+ T-Cell ex vivo polarization into Th17 Cells. *J Nutr* 2013;143(9):1501–8. doi:[10.3945/jn.113.178178](https://doi.org/10.3945/jn.113.178178).
- [85] Howland SW, Claser C, Poh CM, Gun SY, Rênia L. Pathogenic CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *Semin Immunopathol* 2015;37(3):221–31. doi:[10.1007/s00281-015-0476-6](https://doi.org/10.1007/s00281-015-0476-6).
- [86] Villegas-mendez A, Greig R, Shaw TN, de Souza JB, Gwyer-Findlay E, Stumhofer JS, et al. IFN- $\gamma$  producing CD4 + T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8 + T cell accumulation within the brain. *J Immunol*. 2012;189(2):968–79. doi:[10.4049/jimmunol.1200688](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200688).
- [87] Haque A, Best SE, Unosson K, Amante FH, de Labastida F, Anstey NM, et al. Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2011;186(11):6148–56. doi:[10.4049/jimmunol.1003955](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003955).
- [88] Nitcheu J, Bonduelle O, Combadiere C, Tefit M, Seilhean D, Mazier D, et al. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8 + T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J Immunol* 2003;170(4):2221–8. doi:[10.4049/jimmunol.170.4.2221](https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.2221).
- [89] Riggle BA, Miller LH, Pierce SK. Desperately seeking therapies for cerebral malaria. *J Immunol* 2020;204(2):327–34. doi:[10.4049/jimmunol.1900829](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900829).
- [90] Barrera V, Haley MJ, Strangward P, Attree E, Kamiza S, Seydel KB, et al. Comparison of CD8+ T cell accumulation in the brain during human and murine cerebral malaria. *Front Immunol* 2019;10:1747. doi:[10.3389/fimmu.2019.01747](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01747).
- [91] Lalancette-Hebert M, Julien C, Cordeau P, Bohacek I, Weng YC, Calon F, et al. Accumulation of dietary docosahexaenoic acid in the brain and development of postischemic neuronal damage. *Stroke* 2011;42(10):2903–9. doi:[10.1161/STROKEAHA.111.620856](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.620856).
- [92] Rosa AS, Bandeira LG, Monte-Alto-Costa A, Romana-Souza B. Supplementation with olive oil, but not fish oil, improves cutaneous wound healing in stressed mice. *Wound Repair Regen* 2014;22(4):537–47. doi:[10.1111/wrr.12191](https://doi.org/10.1111/wrr.12191).
- [93] Burger B, Kühl CMC, Candreva T, Cardoso RDS, Silva JR, Castelucci BG, et al. Oral administration of EPA-rich oil impairs collagen reorganization due to elevated production of IL-10 during skin wound healing in mice. *Sci Rep* 2019;9(1):9119. doi:[10.1038/s41598-019-45508-1](https://doi.org/10.1038/s41598-019-45508-1).