

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA
COINFECCÃO EXPERIMENTAL POR *Ascaris suum* E
Plasmodium berghei NK65**

FLAVIANE VIEIRA SANTOS

BELO HORIZONTE - MG
Fevereiro/2019

FLAVIANE VIEIRA SANTOS

**ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA
COINFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Ascaris suum* E
Plasmodium berghei NK65**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia

Orientadora: Profª. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Área de concentração: Imunoparasitologia

Belo Horizonte - MG

Fevereiro/2019

FLAVIANE VIEIRA SANTOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - LIGP, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno.

COLABORADORES

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Dra. Denise Silva Nogueira

Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira

MSc. Lucas Kraemer Rocha

Dra. Patrícia Silveira

Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB/UFMG

Prof. Dr. Remo Castro Russo

Departamento de Patologia – ICB/UFMG

Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliar

ÓRGÃO FINANCIADOR: CNPq

Dedico este trabalho à minha família e amigos, sobretudo a minha mãe, Joselita, exemplo de força e perseverança.

É pau, é pedra, é o fim do caminho
É um resto de toco, é um pouco sozinho
É um caco de vidro, é a vida, é o sol
É a noite, é a morte, é o laço, é o anzol
É peroba do campo, é o nó da madeira
Caingá, candeia, é o Matinta Pereira
É madeira de vento, tombo da ribanceira
É o mistério profundo, é o queira ou não queira

É o vento ventando, é o fim da ladeira
É a viga, é o vão, festa da cumeeira
É a chuva chovendo, é conversa ribeira
Das águas de março, é o fim da canseira
É o pé, é o chão, é a marcha estradeira
Passarinho na mão, pedra de atiradeira
É uma ave no céu, é uma ave no chão
É um regato, é uma fonte, é um pedaço de pão

(..)

É pau, é pedra, é o fim do caminho
É um resto de toco, é um pouco sozinho
É um passo, é uma ponte, é um sapo, é uma rã
É um belo horizonte, é uma febre terça
São as águas de março fechando o verão
É a promessa de vida no teu coração.

JOBIM, T. Águas de Março.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jailton e Joselita, por terem me criado com amor e dedicação, e à minha irmã, Francielly, pelo companheirismo e amizade.

Ao meu namorado Wilson, pessoa mais especial que encontrei na vida, obrigada por cuidar de mim durante essa jornada! Te amo!

À Nami e ao Zoro, dois seres iluminados!

Aos meus amigos da minha terra natal, em especial, ao Vini pelos bons papos, sempre atuais!

Aos amigos maravilhosos que fiz em BH, pelo apoio, compartilhamento de experiências, ideias e pelos momentos felizes.

À minha orientadora Lilian, por todos os ensinamentos, apoio e confiança.

Aos pesquisadores Marcelo Vidigal Caliari, Patrícia Silveira, Remo Castro Russo e Ricardo Toshio Fujiwara, pelas importantes contribuições na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), em especial, aos meus veteranos Denise, Fabrício, Lucas, Thaís Leal, e as meninas da malária Ana Cristina, Izabella e Luíza Padrão, pelo acompanhamento, compartilhamento de ideias e amizade!

À Michele e à Vanessa, por toda ajuda, paciência, competência, conselhos e amizade.

Às amigas feitas no mestrado, em especial, à Andreza, Bárbara, Isabela, Ludmila e Olívia, por tornarem os dias mais agradáveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, em especial, à Sumara e Sibebe, pela competência, apoio e carinho.

Às agências financiadoras, CAPES e CNPq.

RESUMO

A ascaridose e a malária são doenças parasitárias altamente prevalentes nas regiões tropicais e subtropicais e, portanto, frequentemente apresentam sobreposição de áreas endêmicas, contribuindo para altos índices de morbidade e mortalidade em áreas com condições sanitárias precárias. No entanto, vários estudos que visam correlacionar os efeitos das infecções por helmintos na malária apresentam resultados contraditórios e inconclusivos. Assim como na maioria das infecções por nematódeos gastrointestinais, a resposta imune na ascaridose é tradicionalmente caracterizada pela participação de citocinas IL-5, IL-4 e IL-13 e reguladoras IL-10 e TGF- β , além de elevados níveis circulantes de IgE total e específica. No entanto, atualmente sabe-se que o desenvolvimento das respostas Th2 e T reguladora nas infecções por nematódeos gastrointestinais é concomitante com a modulação da resposta Th1, considerada crucial para o controle imunológico de inúmeras infecções virais, bacterianas e, também, nas causadas por protozoários, como o *Plasmodium* spp., cuja proteção da infecção é mediada pela produção de citocinas IFN- γ e TNF- α . Portanto, a coinfeção por *Ascaris* spp. tem forte potencial para influenciar significativamente o percurso de infecções por protozoários. O presente trabalho visou descrever e caracterizar aspectos fisiopatológicos e imunobiológicos envolvidos na coinfeção experimental de *Ascaris suum*, durante a ascaridose larval e *Plasmodium berghei* NK65. Os resultados deste trabalho demonstraram que camundongos coinfectados apresentaram alteração da cinética de migração de larvas associado ao aumento de larvas recuperadas nas vias aéreas. Foi evidenciado a presença de lesão hepática e pulmonar, que levaram ao comprometimento da função desses órgãos. Finalmente, foi demonstrado que a coinfeção resulta na regulação negativa das respostas Th1, Th17, Th2 e Treg, que refletiu na grave morbidade e mortalidade dos animais.

Palavras-chave: Ascaridose, malária, coinfeção, inflamação, imunomodulação.

ABSTRACT

Ascariidosis and malaria are parasitic diseases prevalent in tropical and subtropical regions, and frequently sharing overlapping endemic areas, which contributes to high rates of morbidity and mortality in areas with poor sanitary conditions. Despite several studies suggesting possible influence of helminth infections on the morbidity of malaria, mostly results are still contradictory and inconclusive. The immune response in ascariidosis is characterized by the involvement of IL-5, IL-4 and IL-13 cytokines, and the IL-10 and TGF- β regulatory factors in addition to circulating levels of total IgE. On the other hand, the protective immune response against malaria is mediated by the production of cytokines IFN- γ and TNF- α . Therefore, helminth coinfection might have a strong potential to influence the progress of protozoan infections. The present work aimed to describe the pathophysiological and immunobiological features of the experimental coinfection of *Ascaris suum* and *Plasmodium berghei* NK65. Our results demonstrate that coinfection promotes significant changes in the kinetic larval migration, resulting in a higher helminthic parasite burden. Furthermore, it was evidenced a presence of hepatic and pulmonary lesions, which led to the impairment of the physiological function. Finally, the coinfection elicited a downregulation of Th1, Th17, Th2 and Treg responses, which reflected on morbidity and mortality of animals.

Key words: Ascariidosis, malaria, coinfection, inflammation, immune modulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Padrões patogeográficos de 187 doenças infecciosas humanas globais.....	17
Figura 2: Distribuição das geohelmintoses no mundo em 2009.....	25
Figura 3: Estimativa da distribuição espacial da prevalência de infecção por <i>Ascaris lumbricoides</i> no Brasil.....	26
Figura 4: Representação esquemática do ciclo biológico e formas evolutivas do <i>Ascaris</i> spp.....	28
Figura 5: Painel de citocinas da resposta do tipo Th2 em helmintoses.....	33
Figura 6: Países com transmissão contínua da malária, 2013.....	36
Figura 7: Mapa de risco da malária, por município, no Brasil, em 2016.....	37
Figura 8: Número de casos de malária notificados e diferença de percentual entre 2016, 2017 e 2018.....	38
Figura 9: Casos de malária notificados por estado e percentual de participação no total de casos notificados na região Amazônica, 2017 e 2018.....	39
Figura 10: Ciclo biológico do <i>Plasmodium falciparum</i>	41
Figura 11: Resposta imune na fase eritrocítica da malária.....	50
Figura 12: Delineamento experimental da coinfeção por <i>Ascaris suum</i> e <i>Plasmodium berghei</i> NK65.....	56
Figura 13: Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65.....	67
Figura 14: Variação da massa corporal (%) de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65.....	68
Figura 15: Curva de parasitemia e fotomicrografias de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa dos camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65.....	70
Figura 16: Fotomicrografia do baço de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	71
Figura 17: Avaliação semiquantitativa da inflamação e lesão hepática dada por <i>score</i> de inflamação e lesão de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e no vigésimo dia pós-infecção.....	72
Figura 18: Fotomicrografia do fígado de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	73

Figura 19: Enzimas hepáticas dosadas em camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	74
Figura 20: Níveis da atividade de NAG, MPO e EPO no tecido hepático de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	74
Figura 21: Área de espessamento interalveolar do pulmão de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	75
Figura 22: Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por <i>score</i> de inflamação de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	75
Figura 23: Fotomicrografia do pulmão de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	76
Figura 24: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	78
Figura 25: Níveis da atividade de NAG, MPO e EPO e no tecido pulmonar de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	78
Figura 26: Níveis de hemoglobina, proteína total, contagens de células mononucleares e granulócitos no BAL de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	80
Figura 27: Citocinas dosadas no tecido pulmonar de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção.....	81
Figura 28: Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i>	83
Figura 29: Variação da massa corporal (%) de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i>	83
Figura 30: Número de larvas recuperadas dos pulmões dos camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção...	86
Figura 31: Curva de parasitemia dos camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i>	86
Figura 32: Fotomicrografia do baço de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção.....	87
Figura 33: Avaliação semiquantitativa da inflamação e lesão hepática dada por <i>score</i> de inflamação e lesão de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção.....	88
Figura 34: Fotomicrografia do fígado de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção.....	89

Figura 35: Enzimas hepáticas dosadas em camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção.....	90
Figura 36: Níveis da atividade de NAG, MPO e EPO e no tecido hepático de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção. A) Níveis da atividade de NAG. B) Níveis da atividade de MPO.....	91
Figura 37: Área de espessamento interalveolar do pulmão de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção....	91
Figura 38: Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por <i>score</i> de inflamação de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção.....	92
Figura 39: Fotomicrografia do pulmão de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção.....	93
Figura 40: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção.....	94
Figura 41: Níveis da atividade de NAG, MPO e EPO e no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção.....	95
Figura 42: Níveis de hemoglobina, proteína total, contagens de células mononucleares e granulócitos no BAL de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção.....	96
Figura 43: Citocinas dosadas no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i> no sétimo dia pós-infecção.....	98
Figura 44: Modelo representativo com principais alterações fisiopatológicas e imunológicas da coinfeção experimental por <i>Ascaris suum</i> e <i>Plasmodium berghei</i>	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência de doenças tropicais negligenciadas comumente encontrados em áreas endêmicas de malária.....	19
Tabela 2. Análise de hemograma de camundongos infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65.....	69
Tabela 3. Análise de hemograma de camundongos C57BL/6j infectados por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 e/ou <i>Ascaris suum</i>	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de variância

APC- Célula apresentadora de antígeno

As - Animais monoinfectados por *Ascaris suum*

AST - Aspartato aminotransferase

BAL - Lavado broncoalveolar (*Bronchoalveolar lavage*)

BALB/c - Linhagem isogênica de camundongos de pelagem albina

BALT - Tecido linfóide associado ao brônquio (*Bronchus-associated lymphoid tissue*)

B.O.D. - Demanda biológica de oxigênio (*Biochemical Oxygen Demand*)

BSA - Albumina bovina sérica (*Bovine serum albumin*)

C57BL/6j - Linhagem isogênica de camundongos de pelagem negra

CD - grupamento de diferenciação (*Cluster of differentiation*)

CDC - Centro de Prevenção e Controle de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)

CDYN - Complacência dinâmica (*Dynamic compliance*)

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

DALY - Anos de vida perdidos por incapacidade (*Disability-Adjusted Life Years*)

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Etilenodiaminotetracético

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EPO - Peroxidase eosinofílica (*Eosinophil peroxidase*)

FEV - Volume expiratório forçado (*Forced expiratory volume*)

FVC - Capacidade vital forçada (*Forced vital capacity*)

Hb - Hemoglobina

HE - Hematoxilina & eosina

IC - capacidade inspiratória

Ig - Imunoglobulina (*Immunoglobulin*)

IL - Interleucina (*Interleukin*)

ILC - Células linfóides inatas (*Innate lymphoid cells*)

IFN- γ - Interferon-gama

L₁₋₄ - Estádios 1 a 4 do desenvolvimento larval

LPA - Lesão pulmonar aguda

MPO - Mieloperoxidase de neutrófilos

NAG - N-acetilglicosaminidase de macrófagos

NI - Animais não infectados

NKT - Linfócito NKT (*Natural killer T*)

O.D. - Densidade óptica (*Optical density*)

OMS/WHO - Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

OPAS/PAHO - Organização Pan-Americana de Saúde (*Pan American Health Organization*)

OPD - Cromógeno ortofenilenodiamino diidrocloreto (*o-phelylenediaminedihydrochloride*)

(p) - coeficiente de correlação de Spearman

PAMP - Padrões moleculares associados aos patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern*)

Pb - Animais monoinfectados por *Plasmodium berghei* NK65

PbAs - Animais coinfectados por *Ascaris suum* e *Plasmodium berghei*

PBS - Solução fosfato salina (*Phosphate buffered saline*)

pH - Potencial de hidrogênio

RI - Resistência pulmonar (*Lung resistance*)

SDRA - síndrome do desconforto respiratório agudo

SEM - Erro padrão da média (*standard error of the mean*)

T.A. - Temperatura ambiente

TGF- β - Fator de transformação do crescimento do tipo beta (*Transforming growth factor-beta*)

Th1 - Linfócitos T auxiliares secretores de citocinas do tipo um (*T helper-1*)

Th2 - Linfócitos T auxiliares secretores de citocinas do tipo dois (*T helper-2*)

Th17 - Linfócitos T auxiliares secretores de citocinas do tipo dezesseis (*T helper-17*)

TLR - Receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral do tipo alfa (*Tumor necrosis factor-alpha*)

Treg - Células T reguladoras (*Regulatory T cell*)

Tween 20 - Polioxietileno-sorbitano-monolaurato (*Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate*)

UI - Unidade Internacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. COINFECCÕES	17
1.2. ASCARIDOSE	24
1.2.1. Epidemiologia da Ascaridose	25
1.2.2. Ciclo biológico de <i>Ascaris</i> sp.	27
1.2.3. Fisiopatologia e sintomatologia da ascaridose	29
1.2.4. Imunologia da ascaridose	30
1.2.5. Modelo experimental de ascaridose larval	33
1.3. MALÁRIA	34
1.3.1. Epidemiologia da malária	35
1.3.2. Ciclo Biológico de <i>Plasmodium</i> sp.	39
1.3.3. Fisiopatologia e sintomatologia da malária	42
1.3.4. Imunologia da malária	46
1.3.5. Modelo experimental de malária grave	50
2. JUSTIFICATIVA	53
3. OBJETIVOS	54
3.1. OBJETIVO GERAL	54
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4. METODOLOGIA	55
4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	55
4.2. PARASITOS, ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	55
4.2.1. <i>Ascaris suum</i>	55
4.2.2. <i>Plasmodium berghei</i>	55
4.2.3. Animais	55
4.2.4. Delineamento experimental	56
4.3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL	56
4.3.1. Embrionamento dos ovos de <i>Ascaris suum</i>	56
4.3.2. Preparo de ovos e infecção por <i>Ascaris suum</i>	57
4.3.3. Manutenção de <i>Plasmodium berghei</i> NK65	57
4.3.4. Infecção por <i>Plasmodium berghei</i> NK65	58
4.4. AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA	58
4.5. PROCEDIMENTOS DE ANESTESIA E EUTANÁSIA	58
4.6. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE <i>Ascaris suum</i>	59
4.7. DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE <i>Plasmodium berghei</i> NK65	59
4.8. COLETA E PROCESSAMENTO DO SANGUE, ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO	59
4.9. ENSAIOS BIOQUÍMICOS	60

4.9.1. Avaliação da atividade enzimática AST e ALT - função hepática	60
4.10. CARACTERIZAÇÃO DA FISIOPATOLOGIA DA COINFECÇÃO	60
4.10.1. Obtenção, processamento e análise do lavado broncoalveolar (BAL)	60
4.10.2. Avaliação da função pulmonar: espirometria	61
4.10.3. Avaliação histopatológica dos pulmões, fígado e baço	62
4.11. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA	64
4.11.1. Dosagem de citocinas teciduais	64
4.11.2. Quantificação da atividade de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos no tecido pulmonar	64
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5. RESULTADOS	67
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR <i>Plasmodium berghei</i> NK65	67
5.2. A COINFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>Ascaris suum</i> E <i>Plasmodium berghei</i> NK65	82
6. DISCUSSÃO	99
6.1. O modelo experimental de malária grave por <i>Plasmodium berghei</i> NK65	99
6.2. O modelo de coinfeção experimental por <i>Ascaris suum</i> e <i>P. berghei</i> NK65	105
7. CONCLUSÃO	112
8. REFERÊNCIAS	113
9. ANEXOS	150

1. INTRODUÇÃO

1.1. COINFECCÕES

Entende-se por parasitismo como uma associação desarmônica interespecífica na qual uma espécie (o parasito) apresenta uma associação íntima e duradoura com um ou vários organismos hospedeiros, apresentando grau de dependência metabólica variável (BROWN, 1957). Esta relação ecológica é considerada uma das mais importantes forças evolutivas, pois é responsável por processos de adaptação que culminam na coevolução entre os organismos. As infecções espécie-específicas (como a de *Plasmodium* spp.) são descritas como uma das maiores forças evolutivas sobre a população humana (WOOLHOUSE et al., 2002; NACHER, 2011).

Considerando a grande diversidade de parasitos e a plasticidade que esses organismos possuem, não é surpreendente que alguns deles estejam amplamente distribuídos no planeta. Ao mesmo tempo, as populações humanas vem se expandindo mediadas por processo de globalização, que aumentam as chances de contato com uma ou mais populações de parasitos. No entanto, cada espécie de parasito, se distribui de acordo com as condições disponíveis no ambiente para o seu desenvolvimento. Geralmente, em infecções que acometem o homem, a prevalência das parasitoses em uma determinada região depende não só do clima ou da presença de hospedeiros susceptíveis, mas também das condições sociais, política e econômica da população que podem favorecer a disseminação e perpetuação de doenças. Isso explica como determinadas regiões tendem a ser mais acometidas por parasitos (MURRAY et al, 2015; OSAKUNOR et al., 2018) (figura 1).

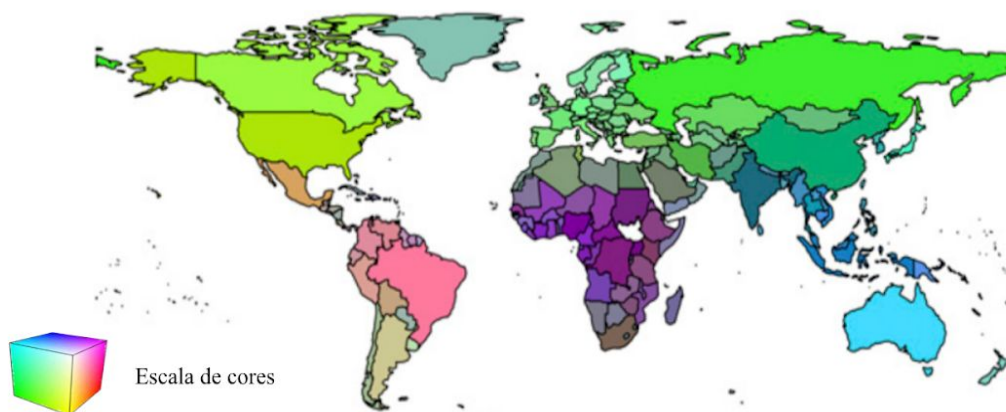


Figura 1: Padrões patogeográficos de 187 doenças infecciosas humanas globais. Cores semelhantes indicam agrupamentos de doenças (humano-específico, zoonótico, transmitido por vetores, não

transmitido por vetores, bacteriana, viral e parasitária) mais semelhantes entre os países. Fonte: Adaptado de Murray et al., 2015.

Infecções concomitantes ou coinfeções, refere-se à situação em que dois ou mais patógenos infectam o mesmo hospedeiro. As coinfeções podem induzir modificações na resposta imune específica para cada parasito isoladamente, influenciando diretamente na susceptibilidade, nas manifestações clínicas e no desfecho clínico das doenças causadas por eles. Essas alterações têm como consequência direta no diagnóstico, tratamento e controle das mesmas (SUSI et al., 2015; VAUMOURIN et al., 2015; BUDISCHAK et al., 2018).

Após o contato com o hospedeiro, os parasitos precisam sobreviver aos diferentes mecanismos desencadeados pela resposta imune inata e adaptativa para que possam se estabelecer (MAIZELS et al., 1993; PEARCE; MACDONALD, 2002; FINLAY; MCFADDEN, 2006; GUPTA et al., 2013; WRIGHT; RAYNER, 2014). Alguns patógenos são capazes de suprimir o sistema imune facilitando a sua permanência, mas também a infecção por outros organismos. Por outro lado, a resposta imune desenvolvida em função de um parasito pode reconhecer outros agentes antígenicamente parecidos, num fenômeno chamado de imunidade cruzada, prevenindo, desta forma, infecções sucessivas ou concomitantes. O ponto negativo para o hospedeiro, é que a imunidade cruzada pode desencadear processos auto-ímmunes quando moléculas de células ou tecidos próprios, também passam a ser reconhecidos (VAUMOURIN et al., 2015). Determinados parasitos podem, ainda, induzir o desenvolvimento de uma resposta imune celular com perfil Th1 ou Th2, sendo o grau e o tipo de polarização dependentes do tipo de patógeno envolvido (SUPALI et al., 2010; VAUMOURIN et al., 2015).

Tradicionalmente, protozoários intracelulares induzem respostas do tipo Th1 e helmintos estimulam respostas do tipo Th2/Treg. Isto é particularmente relevante quando se considera coinfeções por malária, uma vez que os dois tipos de respostas se contrapõem. Em geral, acredita-se que a polarização para um dos dois perfis irá afetar a resposta ao segundo parasito modificando a imunopatologia da doença (SUPALI et al., 2010). A maioria dos estudos de coinfeção leva em consideração essa última abordagem, porém, alterações muito mais complexas podem ocorrer no sistema imune durante as coinfeções o que justificaria alguns resultados inesperados em infecções experimentais ou em estudos longitudinais com populações humanas (NACHER, 2011).

Indivíduos que vivem em áreas endêmicas de malária estão expostos a vários patógenos que causam doenças como úlcera de Buruli, doença de Chagas, cólera, dengue, doença do sono, AIDS, leishmanioses, hanseníase, filariose linfática, tuberculose, esquistossomose e outras helmintoses (RASO et al., 2004; SOKHNA et al., 2004; COHEN et al., 2005; TROYE-BLOMBERG; BERZINS, 2008; ALEMU et al., 2012; LUSTIGMAN et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2012; BHUTTA et al., 2014; TAKEM et al., 2014; KEPHA et al., 2015; OSAKUNOR et al., 2018) (Tabela 1). A bacteremia também é comum em áreas endêmicas de malária e é causa frequente de doença febril e internações pediátricas agudas que podem ser confundidas com malária (WERE et al., 2011). Isso pode levar a um atraso no diagnóstico e falha no tratamento dessas infecções. No entanto, mais frequentemente, as populações que vivem em áreas endêmicas de malária estão poliparasitadas por helmintos (BROOKER et al., 2007; MOLYNEUX et al., 2011).

Tabela 1. Prevalência de doenças tropicais negligenciadas comumente encontrados em áreas endêmicas de malária.

Doença	Agente etiológico	Prevalência global aproximada	Áreas mais afetadas
Ascaridose	<i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Necator americanus</i> e	800 milhões	Ásia, África, América Latina
Ancilostomose	<i>Ancylostoma duodenale</i>	600 milhões	Ásia, África, América Latina
Tricuríase	<i>Trichuris trichiura</i>	600 milhões	Ásia, África, América Latina
Schistosomose	<i>Schistosoma spp.</i> <i>Wuchereria bancrofti</i> ,	200-600 milhões	Ásia, África, América Latina
Filariose linfática	<i>Brugia malayi</i> e <i>Brugia timori</i>	115 milhões	Ásia, África, América Latina
Tracoma	<i>Chlamydia trachomatis</i>	41 milhões	Ásia, África, América Latina
Oncocercose	<i>Onchocerca volvulus</i>	26 milhões	Ásia, África, América Latina
Leishmanioses	<i>Leishmania spp.</i>	12 milhões	Ásia, África, América Latina
Doença de Chagas	<i>Trypanosoma cruzi</i>	10 milhões	América Latina
Hanseníase	<i>Mycobacterium leprae</i>	<0.5 milhões	Ásia, África, América Latina
Tripanossomíases africanas	<i>Trypanosoma brucei</i>	<0.1 milhões	África

Fonte: Adaptado de Hotez, 2011.

1.1.1. Coinfecção entre malária e helmintoses

As infecções por *Ascaris* spp., ancilostomídeos, *Trichuris trichiura* e *Schistosoma* spp. são prevalentes em todas as regiões tropicais do planeta, incluindo as áreas onde os parasitos da malária também são transmitidos (BETHONY et al., 2006; BROOKER, 2010). Esta sobreposição de distribuição resulta em uma alta taxa de indivíduos coinfectados por *Plasmodium* spp. e helmintos em várias regiões do mundo (MWANGI et al., 2006; NACHER, 2011; SALGAME et al., 2013; OSAKUNOR et al., 2018).

Muitos trabalhos visam avaliar a natureza da interação entre *Schistosoma* spp. e *Plasmodium* spp. Alguns estudos relataram diminuição da prevalência, incidência da malária (ARINOLA, 2005; LYKE et al., 2005), bem como a diminuição da carga parasitária e da gravidade da doença (FRIIS et al., 2000; ARINOLA, 2005), outros relataram aumento da prevalência ou risco de infecção pelo *Plasmodium*, da carga parasitária do parasito e ou diminuição dos níveis de hemoglobina e aumento do baço entre indivíduos infectados com *Schistosoma haematobium* (FLOREY et al., 2012; DERIBEW et al., 2013; DOUMBO et al., 2014; DEGARERE; ERKO, 2016; HAILU et al., 2018). Ainda assim, outros estudos relataram neutralidade da coinfecção (SOKHNA et al, 2004; MAZIGOI et al., 2010; GETIE et al., 2015) ou ainda, proteção contra *Plasmodium falciparum* (DOUMBO et al., 2014; LEMAITRE et al., 2014). Portanto, a natureza da associação entre o *Schistosoma* spp. e *Plasmodium* spp. parece variar com a idade dos indivíduos (LYKE et al., 2005) e com a intensidade da infecção pelo *Schistosoma* sp. (SOKHNA et al., 2004; LEMAITRE et al., 2014).

Muitas vezes, a presença de dois helmintos pode potencializar o risco da infecção por *Plasmodium* spp., é o que foi demonstrado em estudo realizado em crianças no Gabão, África. O estudo mostra que a infecção por *Schistosoma haematobium* por si só não aumenta o risco de infecção por *P. falciparum*, mas sua associação com outros helmintos como *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos, aumenta a susceptibilidade do desenvolvimento da malária em crianças com idade variando entre 6 a 10 anos, mas não em crianças mais de 10 a 16 anos (DEJON-AGOBÉ et al., 2018).

Alguns estudos apontam que a coinfecção malária-esquistossomose parece alterar a resposta imune humoral específica contra o plasmódio. Foi demonstrado que os níveis de anticorpos citofílicos antimaláricos direcionados contra o extrato total de *P. falciparum* diminuíram proporcionalmente ao aumento da infecção por esquistossomose (MUTAPI et al., 2007). No Senegal, os níveis dos anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 específicos para antígeno

MSP3 de *P. falciparum*, candidato a uma vacina malárica, estavam diminuídos, enquanto os IgG4 não citofílicos específicos para MSP3 encontravam-se aumentados em portadores de helmintos (ROUSSILHON et al., 2010). Recentemente, uma forte correlação entre resposta IgG3 específica para *Plasmodium* e *Schistosoma* em indivíduos infectados no Quênia, Uganda e Sudão foi descrita, sugerindo que uma reatividade cruzada de anticorpos entre helmintos e plasmódios pode conferir uma proteção a malária nos indivíduos infectados por *Schistosoma* spp. (NAUS et al., 2003; DIALLO et al., 2010).

Os ancilostomídeos causam esfoliação na parede intestinal de seus hospedeiros podendo gerar um quadro de hemorragia resultando na deficiência de ferro (incluindo anemia por deficiência de ferro - IDA) e desnutrição protéica. Os efeitos pioram com o aumento da intensidade da infecção. A anemia, por sua vez, está fortemente ligada ao baixo status de ferro subjacente, à malária, à pobreza e a outros fatores (BROOKER et al., 2006).

Estudos transversais entre mulheres grávidas na Tailândia, Gana e Uganda relataram o aumento da prevalência da malária durante a coinfeção com ancilóstomo (HILLIER et al., 2008; YATICH et al., 2009; BOEL et al., 2010). A infecção por ancilostomídeos também foi associada ao aumento da prevalência da malária (BROOKER et al., 2012; FERNANDEZ-NIÑO et al., 2012; RIGHETTI et al., 2012), da carga parasitária de *Plasmodium* spp. (DEGAREGE et al., 2009) e diminuição do nível de hemoglobina (PULLAN et al., 2010) entre crianças no Zimbábue, Etiópia, Uganda, Quênia, Costa do Marfim e Colômbia. Por outro lado, alguns estudos mostraram falta de associação entre infecção por parasitos e prevalência ou incidência da malária (SHAPIRO et al., 2005; MAZIGO et al., 2010) e carga parasitária de *Plasmodium* sp. (MELO et al., 2010) No entanto, evidências epidemiológicas existentes tendem a sugerir associação positiva entre infecção por ancilóstomos e ocorrência de malária clínica e morbidades associadas.

Infecções por *Ascaris* spp. afetam aproximadamente 800 milhões de pessoas no mundo atingindo altas taxas de endemicidade em países em desenvolvimento (HOTEZ; KAMATH, 2009, PULLAN et al., 2014). Trata-se da doença tropical negligenciada mais prevalente e, por tanto, apresenta muitas áreas de coendemicidade da malária (BROOKER, 2010; HOTEZ, 2011; MURRAY et al., 2015; OSAKUNOR et al., 2018). O primeiro relato de coinfeção de *Ascaris* e *Plasmodium* foi em 1977. Esse estudo mostra que populações extremamente malnutridas, onde pacientes infectados com alta carga parasitária de *Ascaris lumbricoides* estavam livres de malária e que o tratamento destes pacientes para diminuir a

carga de helmintos era acompanhado de um aumento de ataques de malária (MURRAY et al., 1977, 1978). Nos vinte anos seguintes, não houveram outros estudos sobre o assunto, talvez por falta de conexões entre os campos da nutrição e epidemiologia da malária e/ou imunologia. Nas últimas décadas, o tema foi redescoberto, embora a maioria dos trabalhos sejam de caráter epidemiológico.

Vários estudos parecem indicar que a coinfeção por *Ascaris* spp. está associada a uma redução na prevalência e / ou redução da parasitemia (BRUTUS et al., 2007; DEGAREGE et al., 2009; MELO et al., 2010), outros indicam um aumento da incidência e prevalência de malária (NACHER et al., 2002b; SPIEGEL et al., 2003). Contudo, a coinfeção por *Plasmodium* spp. e *Ascaris* spp. também tem sido associada a uma melhor proteção contra a malária grave em adultos (NACHER et al., 2001b, 2002a).

Ensaio clínico randomizado em Madagascar e Ilhas Comores relataram aumento na incidência e parasitemia do *P. falciparum* após o tratamento de crianças com infecção por *A. lumbricoides* (MURRAY et al., 1978; BRUTUS et al., 2007). Da mesma forma, um estudo de coorte no Brasil documentou uma menor queda no nível de hemoglobina entre crianças coinfectadas com *Plasmodium vivax* e *A. lumbricoides* em comparação com crianças infectadas apenas com *P. vivax* (MELO et al., 2010). Além disso, estudos transversais em gestantes, crianças e adultos relataram associação negativa de infecção por *A. lumbricoides* com a prevalência (BOEL et al., 2010), incidência (MURRAY et al., 1977) e intensidade da infecção por *Plasmodium* spp. (DEGAREGE et al., 2009). A infecção por *A. lumbricoides* também foi negativamente correlacionada com a ocorrência de malária cerebral, aumento da temperatura corporal entre os pacientes na Tailândia e diminuição dos níveis de hemoglobina e anemia em crianças de Camarões (NACHER et al., 2000; NACHER et al., 2005; NJUNDA et al., 2015; KWENTI et al., 2016; NJUA-YAFI et al., 2016).

Por outro lado, em um estudo longitudinal entre mulheres grávidas no Gabão e um estudo de caso-controle na Tailândia, os pacientes relataram a associação positiva entre a infecção por *A. lumbricoides* e a incidência de malária (NACHER et al., 2001a; SHAPIRO et al., 2005). Além disso, uma associação positiva entre infecção por *A. lumbricoides* e prevalência de malária foi encontrada entre os pacientes na Etiópia e mulheres grávidas em Gana (YATICH et al., 2009; DEGAREGE et al., 2012). A malária grave parece ser mais comum entre as crianças infectadas por *A. lumbricoides* do que as não infectadas com o helminto (LE HESRAN et al., 2004). Todavia, outros estudos documentaram a falta de

associação entre a infecção por *A. lumbricoides* e a prevalência (MIDZI et al., 2008; FERNANDEZ-NIÑO et al., 2012; ABANYIE et al., 2013) ou incidência de malária (SHAPIRO et al., 2005) e carga parasitária de *Plasmodium* spp. (MELO et al., 2010). No geral, os achados sobre o efeito da infecção por *A. lumbricoides* na malária clínica ou grave são inconsistentes e é difícil fazer uma conclusão clara sobre a natureza da relação entre a ocorrência de infecção por *A. lumbricoides* e o risco de malária com base nas evidências existentes.

Observações de que a infecção helmíntica era protetora contra formas mais graves de malária podem ser explicadas pela indução de altas quantidades de IgE no soro de pacientes (NACHER et al., 2002a; MULU et al., 2014). Além disso, a liberação de outros mediadores inflamatórios como o óxido nítrico, podem contribuir para uma redução da parasitemia e, conseqüentemente, do sequestro de hemácias parasitadas, diminuindo assim as chances de malária cerebral (NACHER et al. 2000; NACHER, 2002a). Outra explicação é que os indivíduos infectados com helmintos apresentam uma maior indução de células T reguladoras, que inibem as células Th1 e sua atividade inflamatória (HARTGERS et al., 2009; WAMMES et al., 2010). Por outro lado, o aumento da incidência de casos clínicos de malária em indivíduos infectados com helmintos pode ser explicado por uma mudança nas subclasses de anticorpos, de subclasses citofólicas protetoras de malária (IgG1 e IgG3) para uma subclasse mais predominante de anticorpos não citofílicos (IgG2, IgG4 e IgM) (DRUILHE et al., 2005).

A disparidade nos resultados da literatura pode ser explicada pela variabilidade no delineamento experimental de cada estudo, o tipo e tamanho da amostragem (crianças, gestantes, indivíduos imunocomprometidos que estavam desnutridos ou tinham outras infecções virais, bacterianas, parasitárias ou crônicas), bem como aspectos relativos a variação entre diferentes localizações geográficas em seu grau de endemidade para malária e helmintos. Outro aspecto a ser considerado é que os estudos sobre os efeitos imunológicos das infecções helmínticas tendem a agrupar esses parasitos em um único grupo, com base na suposição de que eles induzem respostas imunes similares. Os helmintos também diferem, dentre outras características biológicas, nas estratégias de aquisição de recursos energéticos que podem ter implicações nas interações entre coinfeções; por exemplo, ancilostomídeos e *Schistosoma* spp. se alimentam de sangue enquanto *Ascaris lumbricoides* não (BUDISCHAK et al., 2018). No entanto, a partir de estudos epidemiológicos, fica claro que diferentes

helmintos podem ter diferentes interações com o hospedeiro (NAING et al. 2013; CAMPBELL et al, 2016; DEGAREGE; ERKO, 2016).

Em suma, existe maior consenso na literatura sugerindo que o *Schistosoma mansoni* e infecções por ancilostomídeos podem aumentar o risco de malária clínica e morbidades associadas. No entanto, os achados sobre o efeito da infecção por *A. lumbricoides* e *Schistosoma haematobium* na malária clínica são contraditórios. Além disso, a natureza da relação entre a infecção por helmintos e a malária grave também não foi determinada (FERNÁNDEZ-NIÑO et al., 2011; CAMPBELL et al., 2016; DEGAREGE; ERKO, 2016). No entanto, a avaliação dos mecanismos que governam estas interações e explicam os seus efeitos no desfecho das doenças nas coinfeções são menos comuns.

Nos próximos tópicos deste referencial teórico serão apresentados aspectos da epidemiologia, biologia, sintomatologia, patofisiologia e imunologia associada a *Ascaris* spp. e *Plasmodium* spp.

1.2. ASCARIDOSE

Os helmintos transmitidos pelo solo, ou geohelmintos, são um grupo de parasitos do filo nematoda, cuja infecção se dá através do contato com ovos ou larvas infectantes, que se desenvolvem em solo quente e úmido (BETHONY et al., 2006; OJHA et al., 2014). A maioria dessas doenças ocorrem em locais onde a pobreza, falta de saneamento básico e educação em saúde são significativos (BROOKER, 2010; LAMBERTON; JOURDAN, 2015).

Dentre os geohelmintos que afetam o homem, *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758), popularmente conhecido como lombriga, é de longe o que apresenta maiores taxas de infecção (BETHONY et al., 2006; SABOYÁ et al., 2013). Esse geohelminto pertence a classe Chromadorea, ordem Rhabditida, família Ascarididae e a infecção causada por ele, a ascaridose, é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) como pertencente ao grupo das doenças tropicais negligenciadas (HOTEZ et al., 2008; BLAXTER; KOUTSOVOULOS, 2015).

1.2.1. Epidemiologia da Ascarirose

A ascarirose humana representa um problema de saúde pública e possui grande impacto socioeconômico refletindo em uma perda anual estimada de 1,31 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs), medida que leva em consideração a soma dos anos de vida perdidos por morte prematura e o número de anos vividos com alguma incapacidade devido à morbidade causada pela doença (BETHONY et al., 2006; WHO, 2012; HOTEZ et al., 2014).

Estima-se que 800 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas por *Ascaris* spp., sendo que destas, aproximadamente 59 milhões apresentam elevado risco de desenvolverem alguma morbidade resultando entre 10 a 60 mil óbitos anualmente (SILVA et al., 1997a; HOTEZ et al., 2008; PULLAN et al., 2014). Ainda que esse helminto tenha distribuição em países economicamente desenvolvidos (WHO, 1987; SILVA et al., 1997; BRENDAALL et al., 2011; UMETSU et al., 2014; MILLER et al., 2015), as altas taxas de infecção prevalecem sobre países em desenvolvimento na Ásia, África e América Latina (CHAN, 1997; BROOKER, 2010; FONSECA et al., 2010; HOTEZ et al., 2014; PULLAN et al., 2014) (figura 2).

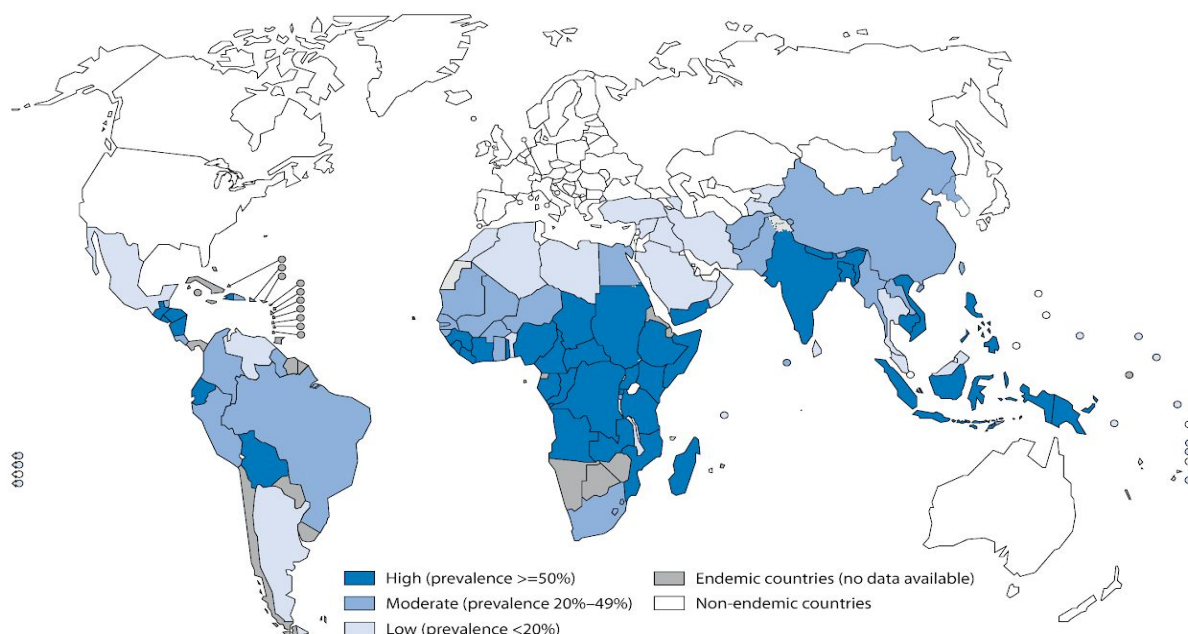


Figura 2: Distribuição das geohelmintoses no mundo em 2009. Fonte: WHO, 2010.

Na África subsaariana estima-se que cerca 173 milhões de pessoas estejam infectadas por *A. lumbricoides* (25% da população), enquanto que na América Latina e Caribe são

aproximadamente 86 milhões, nessas regiões, estima-se que 514 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença (HOTEZ; KAMATH, 2009; PULLAN et al., 2014). Aproximadamente, 50% da prevalência da ascaridose nessas regiões ocorre no Brasil (HOTEZ et al., 2008; SCHOLTE et al., 2013) (figura 3).

De acordo com os dados da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/PAHO), entre 1995 a 2009 foi verificada prevalências de *A. lumbricoides* acima de 50% em vários municípios do Brasil localizados nos estados de Alagoas (57,0%), Amazonas (51,2 %), Maranhão (61,5 a 64,7%), Minas Gerais (57,8 a 65,5%), Paraná (73,0 a 88,0%), Pernambuco (79,3 a 80,3%) e Rio Grande do Sul (51,0%) (CHAMMARTIN et al., 2014). No entanto, Scholte et al. (2013), utilizando modelagem geostatística bayesiana avançada, estimaram que a prevalência atual do *A. lumbricoides* do Brasil é em média de 15,6%, com cerca de 29,7 milhões de brasileiros infectados. O estudo apontou a influência das condições climáticas sobre a distribuição de geohelmintos no Brasil, em que destacam como principais áreas de risco, a região Norte e ao longo da maior parte das áreas costeiras do Brasil (figura 3).

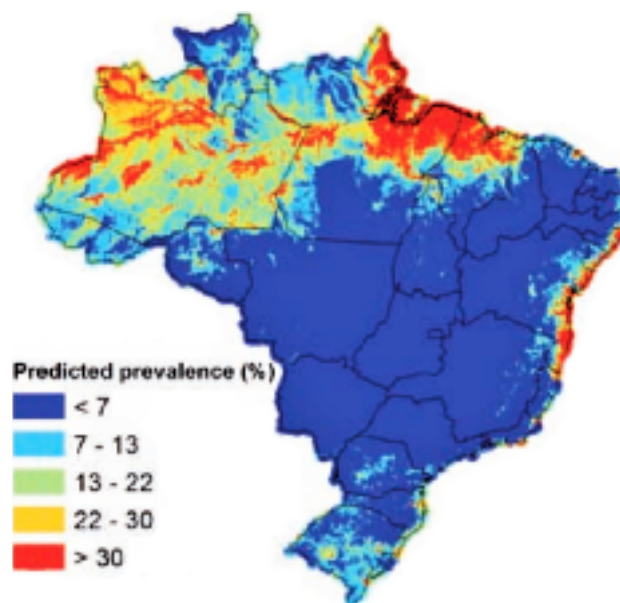


Figura 3: Estimativa da distribuição espacial da prevalência de infecção por *Ascaris lumbricoides* no Brasil. Fonte: Adaptado de Scholte et al., 2013.

Em meados da década de 50, um outro nematódeo da mesma família Ascarididae, *Ascaris suum* (Goeze, 1782), tornou-se motivo de preocupação e discussão científica. *A. suum* é o agente etiológico da ascaridose suína, doença de distribuição cosmopolita que, em cargas parasitárias elevadas, influencia diretamente na saúde e na performance desses animais resultando na queda da produção e condenação do fígado, motivo de grande perda para o

setor pecuário (FAGERHOLM et al., 1988; STEWART; HALE, 1988; THAMSBORG et al., 2013).

Muito se tem debatido sobre a possibilidade de *A. suum* e *A. lumbricoides* serem a mesma espécie e de ocorrer transmissão cruzada entre homens e suínos (LELES et al., 2012; BETSON et al., 2014). Contudo, apesar dos ovos de ambas espécies serem indistinguíveis, tendo o ciclo de vida e a forma de transmissão semelhantes ao *A. lumbricoides*, esses nematódeos são considerados espécies distintas, através de observações epidemiológicas e principalmente em distinções anatômicas dos dentículos das cápsulas bucais nas formas adultas (SPRENT, 1952; ANSEL; THIBAUT, 1973; LELES et al., 2012). Entretanto, a discussão que considera essas espécies sinônimas se fortaleceu a partir de inúmeras evidências do caráter antroponótico de *A. suum* (TAKATA, 1951; ANDERSON, 1995; ARIZONO et al., 2010; NEJSUM et al., 2012), e do potencial zoonótico confirmado de *A. lumbricoides* (GALVIN, 1968). Além disso, Liu et al. (2012) forneceram fortes evidências a partir da análise de DNA mitocondrial de que *A. lumbricoides* e *A. suum* possivelmente são a mesma espécie.

Diversos fatores podem influenciar na transmissão de *Ascaris* spp., dentre eles, destacam-se a idade do hospedeiro e as condições do ambiente. Em relação à idade do hospedeiro, a infecção pode ocorrer em todas as faixas etárias. Contudo, as crianças em idade escolar são as mais susceptíveis já que o pico de prevalência e de intensidade da doença ocorre entre seis a dez anos de idade (MARTIN et al., 1983; LUSTIGMAN et al., 2012). Em relação aos fatores ambientais, o risco de transmissão de *Ascaris* spp. se relaciona positivamente em ambientes com condições de alta umidade bem como de características do solo como acidez, aridez e temperatura (que faz acelerar o desenvolvimento dos ovos) (BROOKER et al., 2004; PULLAN; BROOKER, 2012; CHAMMARTIN et al., 2013; SCHOLTE et al., 2013; CHAMMARTIN et al., 2014). Por outro lado, ações de saneamento se associam com um risco reduzido de transmissão de helmintoses em geral (ALBONICO et al., 2006; BARRETO et al., 2010; DOLD; HOLLAND, 2011; ZIEGELBAUER et al., 2012).

1.2.2. Ciclo biológico de *Ascaris* sp.

O ciclo biológico de *Ascaris* spp. é monoxênico e envolve três estágios biológicos: ovos, larvas e vermes adultos (figura 4). Os ovos deste parasito medem de 60 a 70 µm de comprimento e 40 a 50 µm de largura, apresentam cor castanha devido aos pigmentos biliares

contido nas fezes e apresentam um envoltório formado por três camadas: a membrana vitelina, camada mais interna, composta por lipídeos; uma camada intermediária mais espessa, quitinosa e transparente e; membrana mamilonada, camada mais externa, grossa, de superfície irregular e composta por mucopolissacarídeos (KHUROO, 1996).

As formas adultas são grandes, cilíndricas e com extremidades afiladas. Todo o corpo do verme adulto é recoberto por uma camada quitinosa externa, anucleada, secretada pelo epitélio subjacente. A boca abre-se na extremidade anterior e possui três lábios. Apresentam dimorfismo sexual: as fêmeas medem de 35 a 40 cm e possuem a extremidade posterior retilínea; os machos medem 15 a 30 cm de comprimento com a extremidade posterior encurvada na direção ventral.

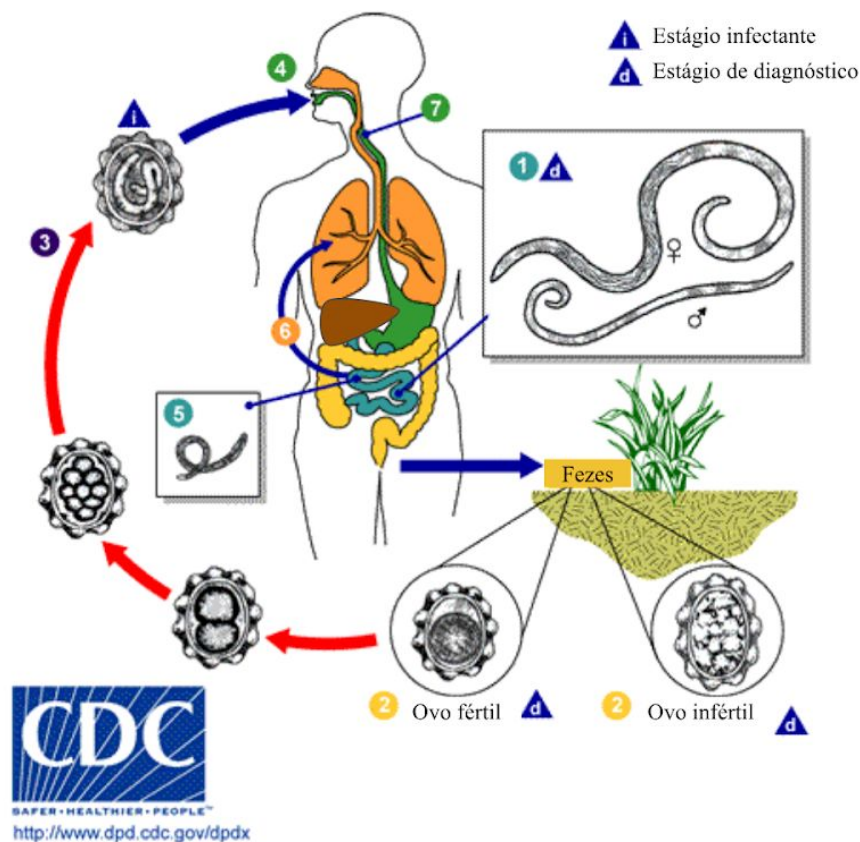


Figura 4: Representação esquemática do ciclo biológico e formas evolutivas do *Ascaris* spp.
 Fonte: Adaptado de Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC).

O hospedeiro susceptível torna-se infectado quando ingere ovos contendo a larva infectante (L_3). Após a ingestão, os ovos alcançam o intestino delgado, se rompem no intestino grosso onde as larvas são liberadas. Em seguida, na mucosa intestinal, as larvas caem na corrente sanguínea e são carregadas inicialmente para o fígado através da circulação portal e posteriormente para o coração e pulmão (MURRELL et al., 1997). No pulmão as

larvas saem da circulação, penetram no parênquima pulmonar e atingem os espaços alveolares. Instaladas nos alvéolos pulmonares, as larvas sofrem uma muda para L₄ e ascendem a árvore brônquica passando pelos bronquíolos, brônquios, traqueia e laringe, onde provocam efeito expectorante no hospedeiro e então as larvas são expelidas ou novamente deglutidas (DOLD; HOLLAND, 2011b). A complexidade dessa migração coincide com importantes mudanças no desenvolvimento do nematódeo na expressão diferenciada de antígenos de superfície e secretado/excretado que estimulam a resposta imunológica do hospedeiro (JEX et al., 2011) (ver item 1.2.4.). Uma vez deglutidas, as larvas atingem o intestino delgado, transformando-se em juvenis, que, ao alcançarem a maturação sexual, tornam-se vermes adultos prontos para a reprodução podendo sobreviver por alguns anos no intestino delgado do hospedeiro. Após acasalamento, fêmeas iniciam a postura de milhares de ovos que são liberados nas fezes do hospedeiro diariamente (em média, 200.000 ovos/fêmea adulta). Os ovos férteis são liberados juntos com as fezes e permanecem viáveis no solo por longo período e, em condições favoráveis para seu desenvolvimento, tornam-se embrionados e a larva formada sofre duas mudas até atingir o estágio infectante (L₃) (KENNEDY, 1998; CROMPTON, 2001; DOLD; HOLLAND, 2011b; HOLLAND et al., 2013).

1.2.3. Fisiopatologia e sintomatologia da ascaridose

A ascaridose humana pode ser dividida em duas fases distintas caracterizadas por aspectos biológicos específicos do agente etiológico. A fase inicial, denominada de ascaridose larval ou aguda, é causada pela migração hepato-traqueal das formas larvais do parasito (Ciclo de Loss). Foram registrados as seguintes manifestações clínicas de fase aguda: hematêmese (AHMED et al., 2015), pneumonite eosinofílica (HERRERA; MENESES, 2005; CHITKARA; KRISHNA, 2006, HOENIGL et al., 2011), obstrução intestinal aguda ou subaguda (LOUW, 1966; SILVA et al., 1997b; MWENDA; ILKUL, 2013), apendicite (LOUW, 1966), abscesso hepático (CHAUHAN et al., 2015), ascaridose pancreática (LOUW, 1966; GALZERANO et al., 2010; AZHAR et al., 2015) e biliar (LOUW, 1966; MORANO; MORANO, 1988; SANJEEV; LUM, 2012; WANG et al., 2013; ASIF et al., 2014; UMETSU et al., 2014; AZHAR et al., 2015). Além disso, migração larval “atípica” pode causar raras e graves complicações em órgãos não relacionados ao padrão migratório,

como a ascaridose escrotal (DEY et al., 2012). A fase aguda normalmente evolui para a fase crônica intestinal, após estabelecimento dos parasitos no intestino.

As complicações relacionadas à fase crônica se relacionam principalmente com anemia e desnutrição e, como consequência, pode gerar deficiências no desenvolvimento físico e cognitivo dos indivíduos infectados (GREEN, 1957; SILVA et al., 1997a; CROMPTON; NESHEIM, 2002; HOTEZ et al, 2008; JARDIM-BOTELHO et al., 2008). As complicações clínicas observadas nos indivíduos com alta carga parasitária (cerca de 8 - 15% dos infectados), está associada a um quadro de distensão abdominal, náuseas, diarreias e pode ser fatal devido a um quadro de obstrução intestinal provocado pelos vermes adultos (JENKINS; BEACH, 1954).

O diagnóstico da ascaridose é feito através do encontro de ovos do parasito nas fezes do hospedeiro (GALVIN, 1968). Desse modo, o método mais utilizado na rotina dos serviços de saúde, para a identificação de ovos nas fezes de geohelmintos consiste na técnica de sedimentação (Hoffman; Pons; Janer, 1934). Para fins científicos, a OMS recomenda o método de Kato-Katz (KATO; MIURA, 1954; KATZ et al., 1972), que permite a quantificação de ovos por grama de fezes (OPG), desse modo, a determinação da intensidade da infecção em baixa, moderada e alta (WHO, 2002a, 2002b).

1.2.4. Imunologia da ascaridose

Em ambas as fases da infecção por *Ascaris* spp. ocorrem interações entre antígenos do parasito e as células do hospedeiro, que resultam na expulsão ou estabelecimento dos vermes. Na fase aguda da infecção, proteases secretadas pelas larvas têm importante papel na degradação do tecido, necessárias para penetração tecidual durante a migração larval, que, juntamente com antígenos presentes na superfície do parasito, estimulam a resposta imune inata do hospedeiro (CROMPTON, 2001; MCKERROW et al., 2006; JEX et al., 2011). Produtos excretados/secretados por vermes adultos durante a fase crônica da infecção estão envolvidos na indução e modulação da resposta imune do hospedeiro contra o parasito (BRADLEY; JACKSON, 2004; HEWITSON et al., 2009; JEX et al., 2011).

Um aspecto muito importante das infecções por *Ascaris* spp. é a interação com as mucosas gastrointestinal e pulmonar. Células especializadas do epitélio da mucosa e células apresentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas (DC) e macrófagos, reconhecem antígenos do parasito por meio de padrões moleculares associados aos patógenos

(PAMPs), promovendo a liberação de mediadores inflamatórios que ativam granulócitos e que dirigem a resposta imune para o tipo Th2 (WONG et al., 2007; PERRIGOUE et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2010).

Na mucosa pulmonar, o reconhecimento de antígenos da larva induz a formação do tecido linfoide associado ao brônquio (BALT) (WILEY et al, 2009; RANGEL-MORENO, 2011; HWANG et al, 2016). Nesse ambiente, as células epiteliais secretam alarminas IL-25 e IL-33 e, subsequentemente, liberam mediadores como a linfopoetina estromal tímica (TSLP), o fator de transformação do crescimento do tipo beta (TGF- β), IL-10 e ácido retinóico que promovem principalmente a ativação das células linfoides inatas do tipo 2 (ILC 2), como também de macrófagos, células dendríticas, mastócitos e basófilos estimulando a expressão de citocinas IL-13, IL-4 e IL-5 (ANTHONY et al., 2007; ARTIS; GRENCIS, 2008; CERUTTI, 2011). As ILCs e células dendríticas presentes nesse ambiente, por sua vez, ativam as células B1, que produzirão IgA na mucosa (VINK et al., 1999; WONG et al., 2007; PERRIGOUE et al., 2008). A sinalização de IL-4RA é importante para ativação de linfócitos T CD4⁺ e, nos macrófagos, a ação conjunta com a citocina IL-13 é necessária para suprimir a hemorragia e o influxo de neutrófilos, promovendo o reparo tecidual (CHEN et al, 2012; SCHWARTZ et al., 2018). A citocina IL-5, produzida por mastócitos e linfócitos Th2 é essencial para a ativação dos eosinófilos, células da imunidade inata que expressam vários receptores do tipo Toll (TLR) em sua superfície, dentre eles TLR2 e TLR4, que têm a capacidade de se ligar a diferentes antígenos presentes nos helmintos (KITA, 2011). Uma vez ativados, os eosinófilos atuam, sobretudo, na liberação de proteínas granulares tóxicas e mediadores lipídicos (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

Estudos recentes da ascaridose larval em modelo experimental murino, demonstraram que a migração das larvas de *A. suum* pelos pulmões induz uma resposta imune inata e adaptativa, caracterizada pelo aumento da produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (COOPER et al., 2000; MAIZELS et al, 2012; PINEDA; RAMOS 2012; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). Durante o pico da migração das larvas pelos pulmões (sétimo ao oitavo dia da infecção), a elevada produção de IL-6 foi correlacionada com a proeminente infiltração de neutrófilos. Após a passagem das larvas pelo parênquima pulmonar, o infiltrado neutrofilico é substituído por células mononucleares de origem mielóide, que coincide com a elevação gradual de IL-4 e do fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α) no tecido (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). Mais recentemente,

Nogueira et al. (2016) demonstrou por meio de exposições múltiplas a *A. suum*, que os camundongos reinfectados apresentaram uma significativa redução da carga parasitária no pulmão que estava associado a um aumento da celularidade no lavado brônquio-alveolar (BAL). Nesse mesmo estudo, foi observado uma inflamação pulmonar granulocítica robusta com produção sérica de citocinas de perfil Th2/Th17. Tais resultados ressaltam a importância de mediadores inflamatórios na resposta anti-helmíntica desenvolvida pelo hospedeiro durante fase aguda da infecção. No entanto, apesar de detectável no pulmão durante a migração das larvas, o papel das células da imunidade inata e os seus produtos, permanecem desconhecidos na ascaridose larval (NOGUEIRA et al., 2016).

Na fase crônica, assim como em outros nematódeos gastrointestinais, a resposta imune contra *Ascaris* spp. é tradicionalmente caracterizada pela participação de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) e reguladoras (IL-10 e TGF- β), além de elevados níveis circulantes de anticorpos IgG1, IgG4 e IgE total e específica (PALMER et al., 1995; COOPER et al., 2000; GEIGER et al., 2002) (figura 5). Esse perfil de resposta está associado a uma significativa eosinofilia periférica e tecidual, acompanhada por uma mastocitose tecidual intensa (BRADLEY; JACKSON, 2004). A presença dos vermes adultos estimulam mecanismos protetores da mucosa como a secreção de mucinas, o aumento do peristaltismo da musculatura lisa intestinal, como também restringe a proliferação linfocitária e modula a atividade de citocinas típicas da resposta imune Th1 (COOPER et al., 2000; GEIGER et al., 2002; PATERSON et al., 2002; TURNER et al., 2003; BRADLEY; JACKSON, 2004; JACKSON et al., 2004; DAWSON et al., 2005; O'SHIRO et al., 2006; MOLLER et al., 2007; DOLD; HOLLAND, 2011a; REINA et al., 2011).

Apesar da resposta Th2 polarizada na fase crônica, Cooper et al. (2004) demonstraram que não existem evidências de diminuição da expressão de citocinas características da resposta Th1, como o interferon-gama (IFN- γ), em crianças infectadas provenientes de áreas endêmicas, sugerindo a ocorrência de uma resposta sistêmica Th1/Th2 mista. Tal achado é análogo ao observado no início de infecções experimentais por *Ascaris* spp. bem como em infecções naturais e experimentais por outros geohelmintos (COOPER et al., 2000; COOPER et al., 2004; MENDEZ et al., 2005; FUJIWARA et al., 2006; GEIGER et al., 2007; GEIGER et al., 2011; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). Por outro lado, Souza et al. (2004) demonstraram o papel das citocinas IL-4 e IL-10 na modulação da resposta celular tipo Th1 contra antígenos não relacionados à infecção, sugerindo que a infecção ativa por *Ascaris* spp.

está associada à uma supressão inespecífica da resposta imune frente a outros estímulos. Gazzinelli-Guimarães et al. (2017), demonstraram que a migração de larvas de *Ascaris* spp. nos pulmões de camundongos concomitantemente infectados por Vaccinia vírus, modula negativamente a resposta imune celular específica ao vírus no tecido pulmonar, favorecendo a replicação viral, o que induz um aumento significativo na morbidade e mortalidade dos animais coinfectados. Contudo, aspectos da resposta imune na fase aguda da infecção experimental por *Ascaris* spp. restam ainda ser elucidados, sobretudo os mecanismos associados à resposta do hospedeiro frente múltiplas exposições ao parasito bem como na presença de outras infecções (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2017).

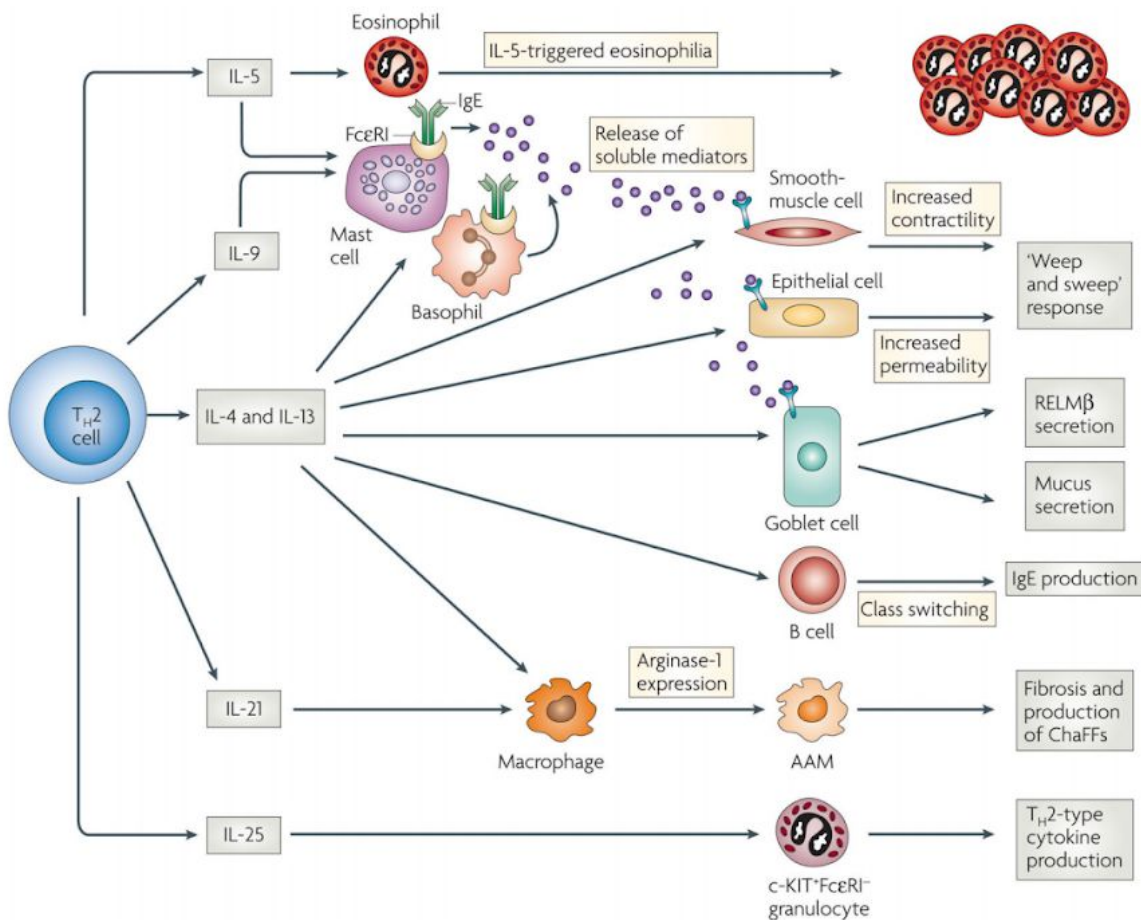


Figura 5: Painel de citocinas da resposta do tipo Th2 em helmintoses. Fonte: Anthony et al., 2007.

1.2.5. Modelo experimental de ascaridose larval

Nas infecções parasitárias, a escolha do modelo animal depende se o modelo já existe ou se de fato a combinação adequada de hospedeiro/parasito pode ser estabelecida experimentalmente. Um modelo apropriado mimetiza o hospedeiro humano, o parasita, e a

maneira pela qual o hospedeiro e o parasito interagem. Contudo, a escolha de espécies animais como modelo para o entendimento das relações parasito-hospedeiro depende do objetivo do estudo e do parasito a ser modelado (BOES; HELWIGH, 2000).

Porcos e primatas são frequentemente, embora nem sempre, modelos mais apropriados e completos, devido às suas muitas semelhanças com os humanos. No entanto, a restrição de ferramentas tecnológicas disponibilizadas para estes modelos bem como o alto custo de manutenção, levam a busca por outros modelos mais versáteis. Por conta disso, os modelos de roedores são, de longe, os modelos animais mais populares e usados com maior frequência para muitos aspectos da doença humana. Camundongos, ratos, hamsters e coelhos são relativamente fáceis de manter e manusear, são menos caros e se reproduzem rapidamente e em grande número, além da notável disponibilidade de diferentes ferramentas genéticas (animais *knockout*) e moleculares que facilitam a compreensão dos fenômenos a serem estudados.

Apesar das claras vantagens do modelo murino, existem limitações na sua utilização na pesquisa helmintológica devido à fisiologia e vida útil relativamente curta do hospedeiro, além das restrições de tamanho do parasito. As limitações de tamanho são mais evidentes para *Ascaris* spp. e *Toxocara* spp., que são os maiores nematódeos intestinais, e normalmente não completam seu ciclo de vida em roedores. Estádios larvais desses helmintos, no entanto, são capazes de migrar e estabelecer em roedores, em cobaias (ROBERTS, 1934) e camundongos (ERIKSEN, 1981; SLOTVED et al. 1998; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). Portanto, a utilização do modelo murino tem sido uma importante ferramenta para o entendimento da imunobiologia da infecção aguda, pois o mesmo mimetiza os eventos migratórios que ocorrem em infecções iniciais por *Ascaris* spp. possibilitando entender os mecanismos da resposta imune presentes durante a doença (SLOTVED et al., 1998; HOLLAND et al, 2013).

1.3. MALÁRIA

Descrita por Hipócrates (460-370 a.C.) que a classificou como uma doença sazonal, a malária está presente na história da humanidade há milhares de anos. Há relatos de prováveis episódios da doença que datam mais de 3.000 anos, em regiões como China, Índia e Grécia (BRUCE-CHWATT, 1985; CARTER; MENDIS, 2002; COX, 2002). No entanto, o agente

etiológico do paludismo, como também é conhecida a doença, só foi descrito no final do século XIX pelo cirurgião militar francês Charles Louis Alphonse Laveran, que encontrou parasitos no sangue de pacientes que possuíam a chamada febre palustre, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de 1907 (KNELL, 1991; COX, 2002).

A malária é causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Haemosporida, família Plasmodiidae. Seis espécies podem causar malária humana: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi e Feletti, 1890), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), *Plasmodium knowlesi* (Giuseppe, 1927) e, mais recentemente, *Plasmodium simium* (da Fonseca, 1951), estas duas últimas em caráter zoonótico (FLORENS et al., 2002; COX-SINGH et al., 2008; WINZELER, 2009; DE ALVARENGA et., 2018).

Os plasmódios são transmitidos ao homem através de vetores, sendo eles mosquitos pertencentes à ordem Diptera, família Culicidae, gênero *Anopheles* (Meigan, 1818). No Brasil as principais espécies transmissoras são: *Anopheles darlingi* (Root, 1926), *Anopheles aquasalis* (Curry, 1932) e *Anopheles albitarsis* (Lynch, 1878) (REBÊLO et al., 1997).

Dentre as seis espécies que infectam o homem, *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes em todo o mundo. O *P. falciparum* é responsável pela forma mais grave da doença, sendo predominante no continente africano, enquanto que a malária causada pela espécie *P. vivax* apresenta grande distribuição geográfica e é considerada benigna, no entanto, a literatura mais recente tem demonstrado um crescente número de casos graves, e esse conceito tem sido debatido (ANDRADE et al., 2010; WHO, 2018).

1.3.1. Epidemiologia da malária

Atualmente a malária está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo endêmica em 91 países. Estima-se que aproximadamente metade da população mundial está sob risco de contrair a doença (figura 6) (WHO, 2017).

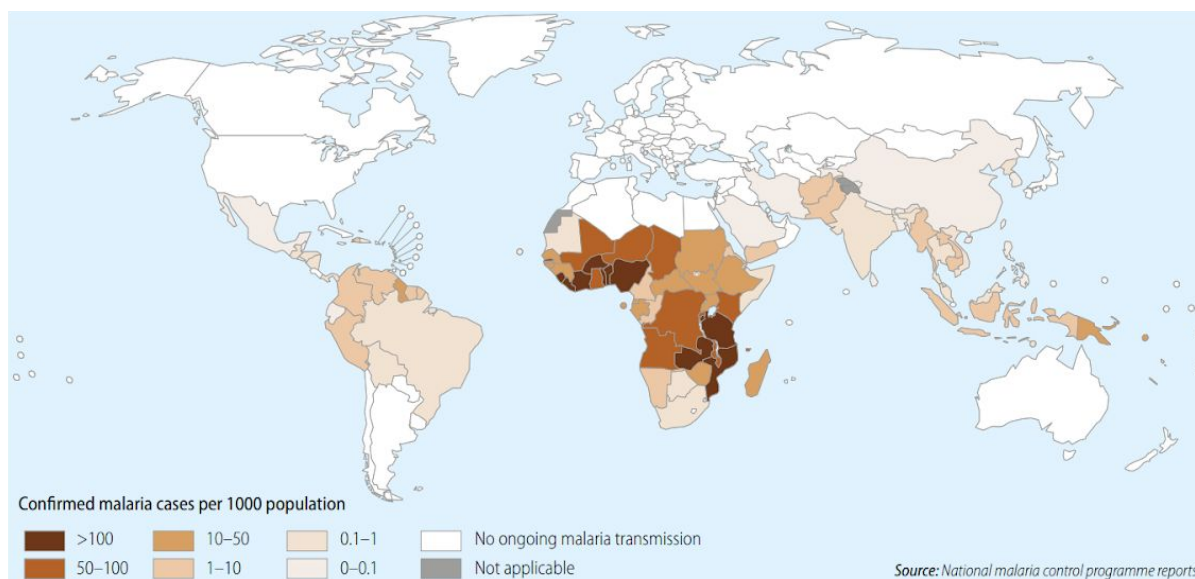


Figura 6: Países com transmissão contínua da malária, 2013. Fonte: WHO, 2014.

A predominância das áreas endêmicas nestas regiões ocorre devido a fatores climáticos (elevada temperatura constante ao longo do ano e alta umidade) que são propícios para a formação de criadouros do mosquito vetor, e as condições sócio-econômicas encontrada nessas localidades, que propicia maior susceptibilidade dessas populações. Em geral, os países que possuem as maiores taxas de mortalidade por malária são aqueles que apresentaram maiores índices de pobreza, o que reflete em taxas de crescimento econômico populacional anual menores, demonstrando uma nítida associação entre malária e pobreza (SACHS; MALANEY, 2002; WHO, 2015).

Em 2017, foram estimados 219 milhões de casos de malária que resultaram em 435.000 mortes. Sendo que os países da África subsaariana respondem por mais de 90% dos casos clínicos de malária no mundo e pela maioria dos casos letais. A prevalência restante está distribuída entre o Sudeste Asiático (5%), Mediterrâneo oriental (2%) e América Latina (1%). O *P. falciparum* é a espécie mais prevalente na África subsaariana, responsável por 99,7% dos casos estimados de malária em 2017. Nas demais regiões endêmicas, *P. vivax* é o parasito predominante, especialmente nas Américas onde representa 74,1% dos casos registrados (WHO, 2018).

Ainda que a taxa de incidência da malária tenha diminuído globalmente entre 2010 e 2017 (239 e 217 milhões de casos, respectivamente), a região das Américas registrou um aumento de 14% dos casos confirmados entre 2010 e 2017 e de 72% entre 2015 e 2017. Somente em 2017, foram 773,5 mil casos confirmados nessa região, sendo que 53% deles

foram registrados na Venezuela, seguido do Brasil (22%), da Colômbia (8%) e do Peru (7%). Durante esse ano, foram estimados 625 mortes por malária, o que significa um aumento considerável se comparado a 2015, quando foram estimadas 316 mortes. No entanto, a América continua sendo o segundo continente, atrás somente da Europa, que registra menos óbitos pela doença (WHO, 2016, 2018).

1.3.1.1. Malária no Brasil

No início do século XX a malária era o maior problema de saúde pública do Brasil, estando presente em 85% do território nacional. Com a proposta da erradicação da doença pela OMS, foram criadas iniciativas como a Campanha de Erradicação da Malária (CEM), que praticamente eliminou a doença nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do país, reduzindo o número de casos de cerca de seis milhões anuais na década de 1940 para menos de 53 mil em 1970 sendo a ocorrência praticamente restrita à região da Amazônia Legal (LOIOLA et al., 2002) (figura 7).

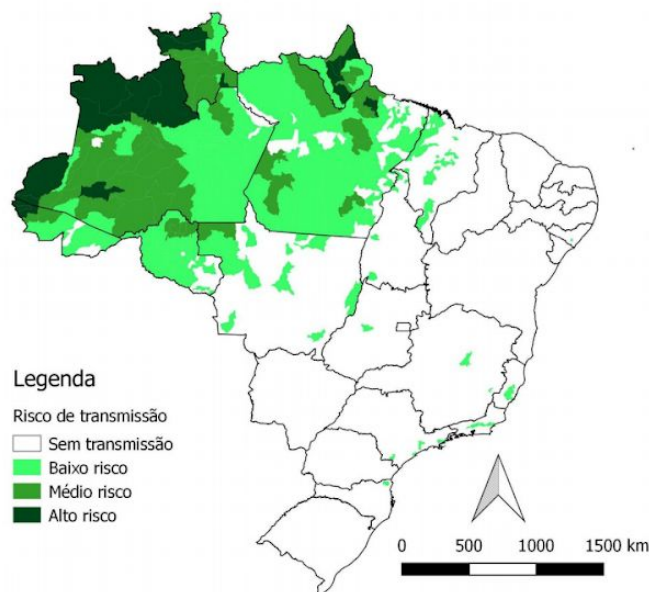


Figura 7: Mapa de risco da malária, por município, no Brasil, em 2016. Baixo risco ($IPA < 10/1000$ habitantes), médio risco ($10,0 \leq IPA \leq 49,9/1000$ habitantes) e alto risco ($IPA > 50,0/1000$ habitantes), sendo que a IPA é Índice Parasitário Anual (número de casos registrados por cada 1000 habitantes de determinada área). Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS.

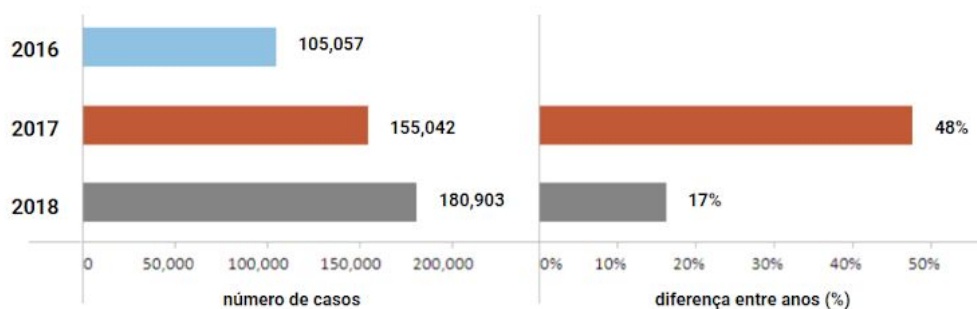


Figura 8: Número de casos de malária notificados e diferença de percentual entre 2016, 2017 e 2018.
Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS

Atualmente, no Brasil, as principais espécies que causam a malária humana são *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, com cerca de 99,7% dos casos ocorrendo nos nove estados da Amazônia Legal, distribuídos em localidades de baixo, médio e alto risco de transmissão (figura 7) (BRASIL, 2018a). Nessa região, as condições ambientais, como elevadas temperatura e umidade e coleções hídricas abundantes, propiciam o desenvolvimento do mosquito vetor (WHO, 2014). É importante ressaltar que o *P. vivax* é a espécie predominante no Brasil sendo responsável por aproximadamente 90% do total de casos registrados (BRASIL, 2018a).

Somente em 2017, a região amazônica contabilizou 155.042 casos de malária, sendo a maioria no Amazonas (67.682) e no Pará (29.403), seguido de Acre (28.079), Amapá (11.795), Roraima (10.347), Rondônia (6.407) e ainda do Maranhão (830), Mato Grosso (428) e Tocantins (71) (figura 9). Apesar do número de casos notificados ter sofrido reduções na última década (em 2008, aproximadamente 312.000 casos, ao passo que, em 2017, 155.000 casos), tem sido observado aumento do número de casos nos últimos dois anos (figura 8). Tais dados estão ligados à falta de investimentos para a manutenção e aperfeiçoamento dos programas de prevenção e controle da doença, envolvendo capacitação de recursos humanos para melhoria na identificação e contenção de surtos da doença (BRASIL, 2018a). Outra situação atual é a entrada de refugiados de países fronteiriços que, devido a instabilidade política desses países, o controle da malária torna-se cada vez mais desafiador. Casos de malária provenientes de países de fronteira representam cerca de 5% dos casos de malária no Brasil no período de janeiro a julho de 2018, 75% desses casos são provenientes da Venezuela (BRASIL, 2018c).

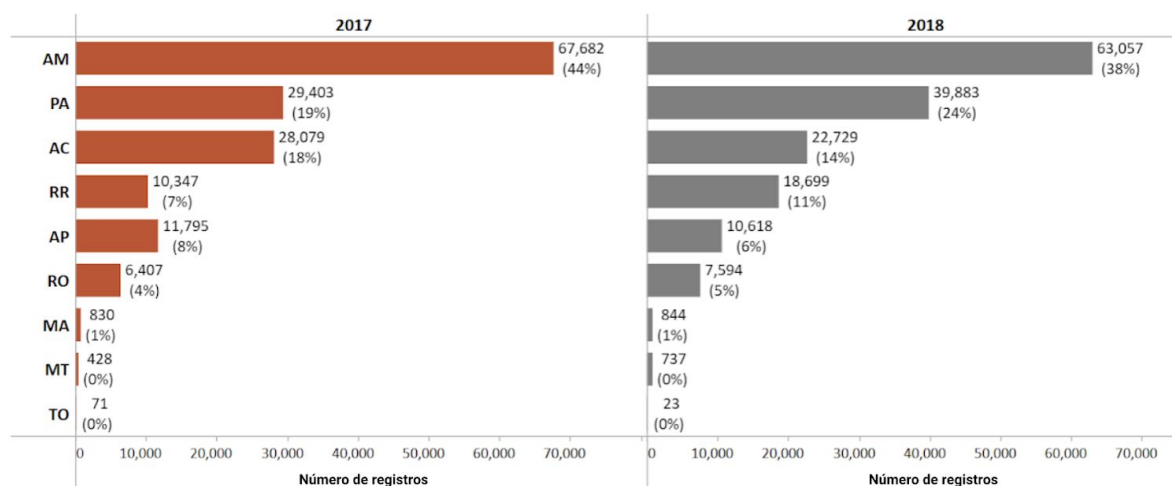


Figura 9: Casos de malária notificados por estado e percentual de participação no total de casos notificados na região Amazônica, 2017 e 2018. Fonte: Sinan/ SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS.

Apesar das campanhas de erradicação da malária iniciadas na década de 1960 e das intensas ações de controle atuais, a doença permanece afligindo as populações mais carentes (WHO, 2016). A complexidade biológica dos plasmódios e a resistência desses parasitos às drogas usuais, muitas vezes utilizadas indiscriminadamente, bem como a dificuldade do controle eficiente do mosquito vetor, em decorrência da resistência aos inseticidas e das mudanças nos parâmetros ecológicos e ambientais, falta de controle de áreas de fronteiras e o enfraquecimento dos sistemas de saúde pública, têm justificado a incapacidade dos países em desenvolvimento, da faixa tropical, no controle da malária (FERREIRA; CASTRO, 2016; OLLIARO et al., 2016; WHO, 2016).

1.3.2. Ciclo Biológico de *Plasmodium* sp.

O ciclo de vida de *Plasmodium* spp. (figura 10), envolve um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor. No hospedeiro vertebrado, a infecção se inicia com a picada da fêmea infectada de mosquitos do gênero *Anopheles*. Durante o repasto sanguíneo, esporozoítos são inoculados juntamente com a saliva na derme do hospedeiro e logo se espalham pelos vasos sanguíneos e linfáticos alcançando por fim, os hepatócitos, onde não são mais detectados na corrente sanguínea (SHIN et al., 1982). No decorrer deste processo, apenas uma pequena parte dos parasitos entra nos capilares sanguíneos enquanto outros são drenados para os vasos linfáticos, atingindo os linfonodos onde são degradados por leucócitos (AMINO et al., 2006). Parasitos que permanecem na derme também são destruídos através da ação dos neutrófilos e mastócitos induzidos pela saliva do mosquito (DEMEURE et al., 2005). Para escapar dessa

resposta inicial, os esporozoítos deslocam-se ativamente através de células do hospedeiro até alcançarem os vasos sanguíneos e por fim atingir o parênquima hepático (AMINO et al., 2008).

O processo de invasão dos hepatócitos é complexo e depende de várias interações do tipo ligante-receptor. Resultados obtidos a partir de estudos com modelo murino sugerem que o contato dos esporozoítos com hepatócitos que expressam elevados níveis de proteoglicanos de heparan-sulfato, ativam o processo de invasão, via proteínas quinase dependentes de cálcio, passando, então, de um fenótipo migratório para um invasivo (COPPI et al., 2007; revisto por EJIGIRI; SINNIS, 2009).

Várias proteínas de *Plasmodium* spp. parecem desempenhar um papel crucial nessa interação entre parasito e célula hospedeira. A proteína circumesporozoíto (CSP), por exemplo, abundante na superfície do esporozoíto, parece interagir com os proteoglicanos de heparan-sulfato presentes no hepatócito, facilitando a internalização do parasito (FREVERT et al., 1993; THOMPSON et al., 2004; PRUDÊNCIO et al., 2006; EJIGIRI; SINNIS, 2009). Outras proteínas, como o antígeno 1 da membrana apical (AMA-1) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP), ambas localizadas nas micronemas, também merecem destaque. A AMA-1 participa na reorientação do parasito, permitindo o estabelecimento de um contato íntimo entre o pólo apical e a célula hospedeira, evento esse que culmina na formação da junção móvel (MITCHELL et al., 2004). A TRAP, por sua vez, é liberada na superfície do parasito durante a invasão e se associa a receptores do hospedeiro, de forma a facilitar a motilidade e a invasão (SOLDATI et al., 2004).

Estabelecida a infecção dos hepatócitos no tecido hepático, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, após sofrerem várias divisões por esquizogonia, formam os esquizontes. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, algumas populações de parasitos se desenvolvem rapidamente nos hepatócitos, enquanto outras, dão origem a formas dormentes denominadas hipnozoítos, responsáveis pelas recaídas tardias da doença (KROTOSKI, 1985; WHITE, 2011; MUELLER et al., 2013). Os esquizontes maduros liberam os merozoítos teciduais através de um processo de brotamento de vesículas (merosomas), que após atingirem a corrente sanguínea, repletos de parasitos, liberam os merozoítos (STURM et al., 2006). Para que o merozoíto invada o eritrócito é necessário que haja também o reconhecimento inicial de receptores específicos (CAMUS; HADLEY, 1985; ADAMS et al., 1992; HORUK et al., 1993; COWMAN; CRABB, 2006).

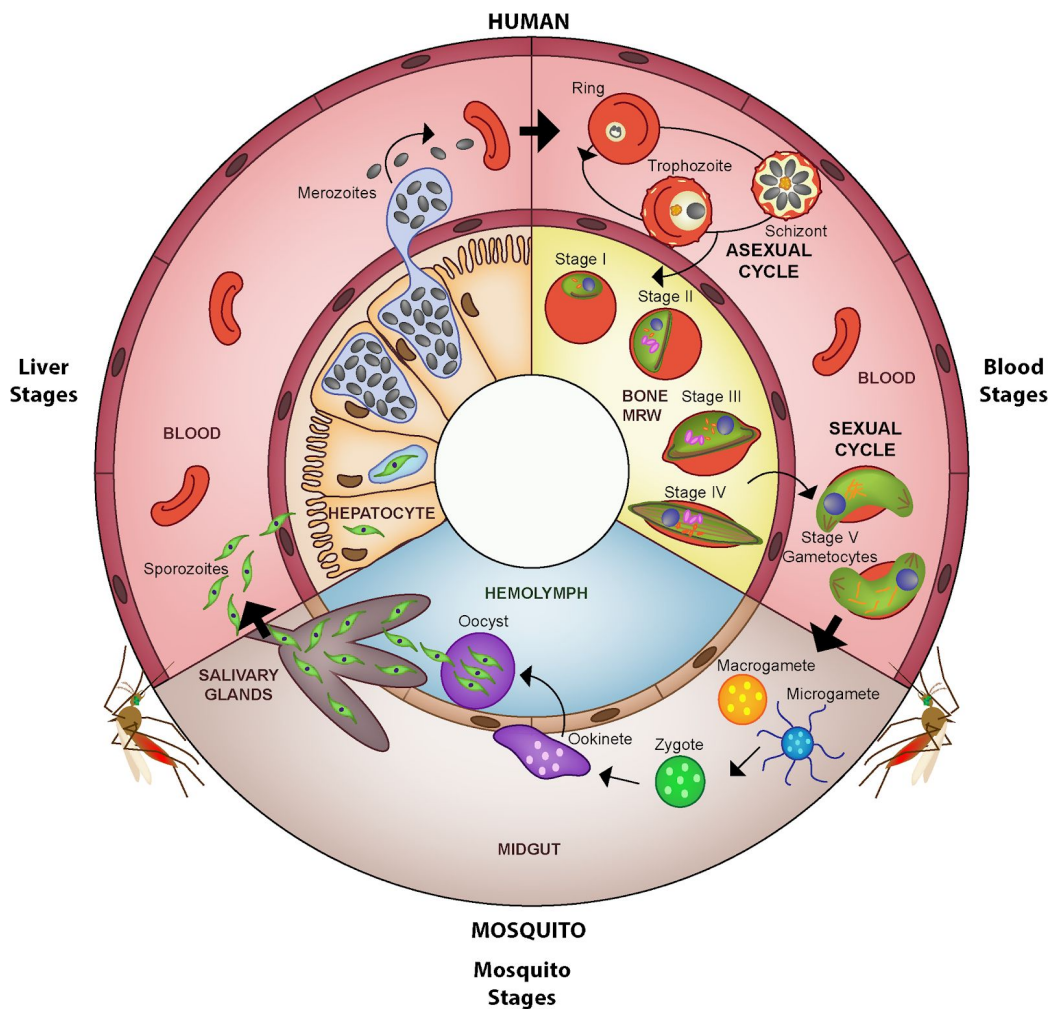


Figura 10: Ciclo biológico do *Plasmodium falciparum*. Fonte: Nilsson et al., 2015.

Após várias gerações de merozoítos sanguíneos, alguns se diferenciam dando origem a formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos, os quais amadurecem sem sofrer divisão celular e são infectantes para o mosquito. O estímulo responsável pela produção dos gametócitos ainda não é bem compreendido, embora tenham sido atribuídas algumas hipóteses como a pré-determinação genética dos parasitos ou a influência de fatores ambientais inerentes ao hospedeiro (DYER et al., 2000; SMITH et al., 2014; JOSLING; LLINÁS, 2015; CARTER et al., 2016; BANSAL et al., 2018). Nas infecções por *P. vivax*, os estágios sexuais circulam precocemente na corrente sanguínea (SATABBONGKOT et al., 2004; SHANKS, 2012).

Dentro do estômago do mosquito, os gametócitos masculinos e femininos se diferenciam transformando-se em gametas (revisto por VLACHOU et al., 2006). Após a fecundação, o zigoto se desloca com movimentos amebóides, passando a se denominar oocineto. O oocineto por sua vez atravessa a parede intestinal do mosquito por um

mecanismo transcelular (BARILLAS-MURY; KUMAR, 2005) alojando-se na membrana basal onde se diferencia em oocisto. No interior do oocisto ocorrem processos de diferenciação e divisão nuclear que culminam na produção de esporozoítos (esporogonia) e em aproximadamente duas semanas, dependendo da espécie do plasmódio, a parede do mesmo se rompe liberando esporozoítos que invadem a hemolinfa do inseto. Assim, muitos esporozoítos migrarão até atingir as glândulas salivares do inseto, completando o ciclo evolutivo dos plasmódios no hospedeiro invertebrado (COWMAN; CRAB, 2006; MUELLER et al., 2010).

1.3.3. Fisiopatologia e sintomatologia da malária

Os sintomas mais frequentes apresentados por indivíduos com malária são decorrentes do ciclo eritrocítico do parasito no momento da ruptura dos eritrócitos infectados desencadeando a liberação de antígenos para a corrente sanguínea com consequente estímulo de reações bioquímicas e imunológicas (MILLER et al., 2002). Dependendo do tempo de infecção e da espécie de parasito infectante, os sintomas podem se apresentar de forma branda, caracterizando a malária não complicada, ou grave, dita complicada.

A malária não complicada é caracterizada principalmente por acessos febris que podem estar acompanhados por outros sintomas como: cefaleia, mialgia, artralgia, vômito, taquicardia, convulsões, dentre outros (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012; PHILLIPS et al., 2017). A malária complicada ou grave, por sua vez, está associada predominantemente às infecções por *P. falciparum* e é caracterizada pelo sequestro/adesão sistêmico de eritrócitos infectados com formas maduras assexuadas do parasito em capilares sanguíneos (GOOD et al., 2005; PHILLIPS et al., 2017). Tal estratégia pode ser vantajosa para o parasito como um mecanismo de evasão do sistema imunológico, ao mesmo tempo que compromete a função de órgãos vitais do hospedeiro (SCHOFIELD; GRAU, 2005). Contudo, o padrão de desenvolvimento da doença e sua evolução para a forma grave estão diretamente ligados a elementos como: idade, fatores genéticos, estado nutricional e imunológico do hospedeiro, bem como o acesso ao diagnóstico e ao tratamento precoce e presença de comorbidades (MILLER et al., 2002; WHO, 2014).

De maneira geral, o agravamento da infecção é a grande causa de morte em crianças de até cinco anos e de gestantes residentes em áreas altamente endêmicas (MUELLER et al.,

2013; PHILLIPS et al., 2017; WHO, 2018). Embora ainda não bem compreendida, a patofisiologia da malária grave ou complicada ocorre devido a interação entre antígenos localizados nas protrusões eletrodensas de eritrócitos infectados, especialmente as proteínas de membrana do eritrócito 1 e 2 (PfEMP1 e PfEMP2), e receptores presentes nas células do hospedeiro como CD36, trombospondina (TSP), ICAM-1, VCAM, E-selectina, Sulfato de Condroitina A (CSA) (principal receptor de citoaderência na placenta), CD-21 e P-selectina (NEWBOLD et al., 1999; CHEN et al., 2000; AIRD et al., 2014; SONI et al., 2017). Esse fenômeno de citoaderência implica na obstrução dos capilares sanguíneos, que induz uma resposta sistêmica capaz de comprometer órgãos vitais como cérebro, pulmões e rins (GRAU; KOSSODO, 1994; BARSOUM, 2000; IDRO et al., 2005; TAYLOR et al., 2012).

A anemia e trombocitopenia são achados laboratoriais mais frequentes nas infecções maláricas, principalmente em pacientes infectados por *P. vivax*, estando a intensidade dessas alterações relacionada com a gravidade da doença (GENTON et al., 2008; TJITRA et al., 2008, LANÇA et al., 2012; WHO, 2014). Estudos realizados na Índia e no Brasil contabilizaram cerca de 30% de pacientes com anemia grave dentre o total de adultos infectados graves (KOCHAR et al., 2009; ANDRADE et al., 2010). Apesar da patogenia da anemia na malária grave ser pouco esclarecido, acredita-se que o quadro clínico (taxa de hemoglobina <5g/100 dL de sangue ou hematócrito <15% em crianças (idade <12 anos) e uma hemoglobina <7 g / dl ou hematócrito <20% em adultos), quando observado em pacientes infectados, deve-se a hemólise dos eritrócitos infectados por *Plasmodium* spp., que libera parasitas e endotoxina da malária (entendido como um complexo de hemoglobina e DNA do parasito), ativando um processo inflamatório que envolve a elevada produção de citocinas IFN- γ e TNF- α /IL-10, capazes de atuarem diretamente na medula óssea reduzindo sua função hematopoiética (WEATHERALL; CLEGG, 2002; CHANG; STEVENSON, 2004; WHO, 2014).

A insuficiência renal aguda também é uma complicação comum da malária e pode ocorrer em cerca de 40% dos pacientes com doença grave por *P. falciparum* mas também é frequentemente encontrada em pacientes infectados por *P. malariae*, apesar de geralmente não resultar doença grave (KOOPMANS et al., 2015).

A patogênese da insuficiência renal aguda na malária ainda não é totalmente compreendida. No entanto, acredita-se que o bloqueio da microcirculação renal devido ao sequestro de eritrócitos infectados, a lesão glomerular e a depleção de volume são possíveis

mecanismos da lesão renal aguda (BARSOUM, 2000). A produção de imunoglobulinas leva à formação de complexos imunes, que estão relacionados à lesão glomerular (DAS, 2008). Além disso, a ativação endotelial mediada pela liberação de citocinas vasoativas, leucotrienos e prostaglandinas, levam a hipovolemia e a redução da viscosidade sanguínea, tal como observado em quadros de sepse (SITPRIJA, 1967; BARSOUM, 2000; CLARK et al., 2006; DONDORP et al., 2008).

Diante da complexidade e gravidade da doença, o correto diagnóstico da malária permite destinar o devido tratamento ao paciente, evitando o desenvolvimento de manifestações graves da doença, além de contribuir para a redução do surgimento e disseminação de casos de resistência a medicamentos, reservando antimaláricos para aqueles que realmente têm malária, diferenciando-os dos acometidos por outras enfermidades febris (WHO, 2001; WERE et al., 2011).

O diagnóstico convencional da doença é feito pela visualização microscópica de trofozoítos e/ou esquizontes do plasmódio em exame da gota espessa de sangue, corada pela técnica de Giemsa (Ross, 1903). Além do baixo custo, essa técnica permite a identificação da espécie do plasmódio e a quantificação da parasitemia (WHO, 2001; BRASIL, 2005). No entanto, apesar de a microscopia ser considerada o padrão-ouro para o diagnóstico e monitoramento do tratamento da malária, essa técnica exige pessoal treinado e experiente no exame de distensões sanguíneas. Por esse motivo, a utilização do teste rápido de diagnóstico de malária (RDT) tem ganhado destaque devido a rapidez e a facilidade de execução dos exames aplicáveis principalmente em áreas de difícil acesso (WHO, 2001, 2018). Os RDTs são testes imunocromatográficos de detecção de antígenos de fluxo lateral, que dependem da captura de anticorpos marcados com corante para produzir uma faixa visível em uma tira de nitrocelulose (MOODY, 2002; WHO, 2015). No entanto, problemas relacionados a baixa sensibilidade, especificidade, número de falsos negativos, além de seu alto custo, restringem sua aplicação (MURRAY et al., 2008; MOUATCHO; GOLDRING, 2013). Com relação à detecção molecular da malária, a OMS recomenda que os testes de amplificação de ácido nucléico, que podem detectar infecções por malária de baixa carga parasitária, sejam considerados apenas para pesquisas epidemiológicas e pesquisas que mapeiem infecções sub-microscópicas (WHO, 2018).

Contudo, a associação de critérios clínicos e epidemiológicos é muito importante para a suspeição da doença, isto é, a presença de sintomatologia geral em paciente procedente de

área sabidamente malarígena obrigatoriamente indica a solicitação do exame laboratorial confirmatório da infecção (WHO, 2018).

1.3.3.1. Acometimento pulmonar associado à malária

Pacientes com malária grave por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. knowlesi* podem desenvolver um quadro de insuficiência respiratória aguda, caracterizado por uma lesão pulmonar aguda (LPA) ou pela síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), complicações graves e de mau prognóstico (MATTHAY; ZEMANS, 2011). A incidência de SDRA em infecções por *P. falciparum*, encontram-se entre 2% a 25% em adultos e a mortalidade pode chegar a 80% quando a ventilação mecânica não está disponível (TAYLOR et al., 2012). Muitos pacientes com malária severa acabam adquirindo a LPA/SRDA durante ou após o tratamento com antimaláricos, em especial, nas infecções por *P. vivax* (TAYLOR et al., 2012). Os sinais clínicos da SDRA incluem sudorese, taquipneia, respiração ofegante, cianose periférica e central, crepitações inspiratórias, sibilos expiratórios e expectoração espumosa (DEATON, 1970; MATTHAY; ZEMANS, 2011; LACERDA et al., 2012).

A SDRA associada à malária é caracterizada pela presença de uma inflamação alveolar difusa acentuada, danos na membrana alvéolo-capilar, edema alveolar e hipoxemia grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ onde, PaO_2 = pressão arterial de oxigênio e FiO_2 = fração inspirada de oxigênio) (MATTHAY; ZEMANS, 2011; LACERDA et al., 2012). Em infecções maláricas esse quadro é desencadeado por resposta inflamatória local que causa danos às células epiteliais alveolares e tecido endotelial dos capilares, dificultando ou impedindo o fluxo gasoso ou hipoxemia (TAYLOR et al., 2012; VAN DEN STEEN et al., 2013).

Os aspectos patológicos da SDRA foram inicialmente descritos por Banchofen e Weibel (1977), onde amostras foram coletadas de pacientes em três fases distintas da SDRA e classificadas como fase aguda ou exsudativa, fase fibroproliferativa e fase crônica (BANCHOFFEN; WEIBEL, 1977). A fase aguda é caracterizada pela perda da função da barreira alvéolo-capilar responsável pelo acúmulo de fluido proteico (edema) no interstício pulmonar e no interior dos alvéolos, ocorre acúmulo de polimorfonucleares, hemorragia e, destruição de pneumócitos do tipo I e tipo II. Os pneumócitos tipo I constituem a vasta maioria da superfície alveolar e são particularmente susceptíveis a lesões. A fase fibroproliferativa tem por característica a hiperplasia de pneumócitos tipo II, que se proliferam com o objetivo de repor os pneumócitos de tipo I que sofreram necrose ou

apoptose e atelectasia devido à diminuição de surfactante. Já na fase crônica tem a resolução do infiltrado celular exacerbado, deposição de colágeno e fibrose (LUH; CHIANG, 2007; MATTHAY; ZEMANS, 2011).

A patogênese da LPA/SDRA associada a malária inicia-se com o reconhecimento do parasito ou do estímulo pró-inflamatório pelos macrófagos alveolares e intersticiais previamente ativados por produtos do parasito como a hemozoína, que produzem citocinas como IL-1, TNF- α , IL-8 e IL-6 promovendo o aumento da permeabilidade do epitélio pulmonar que facilita o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares para o tecido (MOSSER; EDWARDS, 2008; EPIPHANIO et al., 2010; VAN DEN STEEN et al., 2010; SCHNEBERGER et al., 2011; DEROOST et al. 2013). Monócitos inflamatórios quando ativados, produzem citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, incluindo NO e H₂O₂, que são tóxicos para o organismo, provocando lesão tecidual (NATHAN; DING, 2010; MURRAY; WYNN, 2011). Em contrapartida, parte desses macrófagos inflamatórios M1 podem se converter para o tipo M2 desempenhando importante papel na reparação de tecido (WYNN; BARRON, 2010; SINDRILARU et al., 2011). Os neutrófilos por sua vez, atraídos por citocinas como IL-8 e quimiocinas como CXCL2, mudam sua conformação e atravessam o endotélio da microvasculatura pulmonar acumulando-se entre o interstício e os alvéolos, onde atua na produção de elastases, espécies reativas de oxigênio (ROS), mieloperoxidases (MPO), metaloproteinases e na formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) que são tóxicas ao microorganismo invasor, mas que também provocam lesões no tecido (TAYLOR; WHITE, 2002; REUTERSHAN; LEY, 2004; ZARBOCK et al., 2008; SERCUNDES et al., 2016).

Através de estudos experimentais com animais deficientes do receptor endotelial CD36, foi possível demonstrar o provável envolvimento do receptor na fisiopatologia da LPA/SDRA associada a malária como mediador da citoaderência de eritrócitos infectados no endotélio pulmonar (LOVEGROVE et al., 2008; LAGASSÉ et al., 2016). Contudo, os mecanismos exatos que desencadeiam a síndrome ainda permanecem obscuros (MOHAN et al., 2008; AIRD et al., 2014).

1.3.4. Imunologia da malária

A intensidade com a qual os sintomas da malária se manifestam depende de vários fatores, inclusive do estado imunológico do hospedeiro. Já foi demonstrado que indivíduos

residentes em áreas de alta transmissão desenvolvem, ao longo dos anos, a denominada imunidade clínica, capaz de impedir a manifestação de sintomatologia clínica acentuada, embora não proteja quanto à aquisição de novas infecções e nem seja capaz de eliminar completamente os parasitos circulantes (BEJON et al., 2010). Nessas áreas, onde o *P. falciparum* é predominante, as crianças são resistentes à malária grave durante os seis primeiros meses de vida em virtude da transferência de anticorpos protetores IgG da mãe imune para o feto (SEHGAL et al., 1989; CHIZZOLINI et al., 1991; HOGH et al., 1995). Após esse período, as crianças tornam-se altamente susceptíveis à malária grave. No entanto, o aumento da idade das crianças é acompanhado da diminuição de episódios de malária, embora sejam frequentes altas parasitemias acompanhadas de ausência de sintomas (EGAN et al., 1996). Em adultos, observa-se parasitemia baixa ou, em alguns casos, em níveis indetectáveis por métodos convencionais de detecção do parasito, refletindo um equilíbrio da relação parasito-hospedeiro (DRUILHE; KHUSMITH et al., 1987; WEBSTER et al., 2003). Postula-se que fatores associados aos parasitos (tais como elevada variabilidade genética e intenso polimorfismo) e ao hospedeiro (estado gestacional, idade) culminam no atraso da aquisição da imunidade incompleta, dita não esterilizante, por parte do hospedeiro (GUPTA; DAY, 1994; SCHERF et al., 2001; MACKINNON et al., 2005). Contudo, algumas características herdadas geneticamente podem manter o indivíduo naturalmente protegido contra a infecção malárica. Dentre estas, destacam-se a anemia falciforme, talassemia, defeitos na membrana dos eritrócitos (ovalocitoses do Sudoeste Asiático, algumas formas de eliptocitoses) e algumas anormalidades metabólicas (deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase - G6PD) (MIN-OO; GROS, 2005; HEDRICK, 2011).

Em linhas gerais, a resposta imune à malária é bastante complexa podendo ser mediada por diferentes tipos celulares e por anticorpos (figura 11) (MILLER et al., 2013).

A resposta inata contra a malária envolve uma interação complexa entre diferentes tipos celulares que incluem células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas, e macrófagos, células natural killer (NK), células T natural killer (NKT) e células $T\gamma\delta$, estimulados por componentes do parasito (ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002; SCHMIEG et al., 2003; STEVENSON; RILEY, 2004; PARROCHE et al., 2007; BARBALAT et al., 2011; DURAI et al., 2013), assim como do próprio hospedeiro durante a doença (ORENGO et al., 2008; FERREIRA et al., 2011; MANTEL; MARTI, 2014).

A indução dos mecanismos que caracterizam a imunidade inata independe do contato prévio do hospedeiro com o patógeno, indicando que sua ativação resulta do reconhecimento direto de elementos do plasmódio por receptores de reconhecimento de PAMPs (STEVENSON; RILEY, 2004; LANGHORNE et al., 2008). Moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI), hemozoína ligada ao DNA e ácidos nucleicos derivados do plasmódio têm sido postuladas como grandes responsáveis pela indução da produção de citocinas pró-inflamatórias durante a fase aguda da malária. A hemozoína, produto da degradação da hemoglobina pelo parasito, ativa células dendríticas e macrófagos via interação com TLR9 aumentando a produção de citocinas inflamatórias tais como IL-1 β , INF- γ , TNF α , IL-6 e IL-12 (COBAN et al., 2005; PARROCHE et al., 2007; DEROOST et al., 2013) e a ativação de peptídeos antimicrobicidas e também a um aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (AKIRA et al., 2004; GAZZINELLI et al., 2004). De forma semelhante, motivos estimulatórios CpG do DNA do plasmódio ativam a via TLR9 em células fagocitárias competentes, ou ainda, caso o DNA do parasito seja liberado no citosol, promovem a formação de inflamassoma AIM2, responsável pela ativação de caspase-1, clivagem de pró-IL-1 β e liberação de IL-1 β (PARROCHE et al., 2007; KALANTARI et al., 2014). O GPI, expresso na membrana de merozoítos é reconhecido principalmente pelo TLR1, TLR2 ou por TLR4 em células dendríticas, monócitos e células B. Esse reconhecimento induz uma cascata de sinalização intracelular desencadeando na produção de TNF- α , IL-1 β e IL-12 (NEBL et al., 2005). Por outro lado, componentes do próprio hospedeiro como o ácido úrico, um produto do metabolismo das purinas liberado por células mortas, são internalizados por fagolisossomos onde contribuem para a ativação de NLRP3 (também conhecida como criopirina, atua como componente do inflamassoma) e a resposta inflamatória durante a malária. Microvesículas com efeitos modulatórios também se formam durante a infecção com o *Plasmodium* ativando TLR4 (ORENGO et al., 2008; MANTEL; MARTI, 2014).

Apesar da importância no combate a infecção malárica, o IFN- γ , bem como outras citocinas que desempenham papel inflamatório, deve ser induzido e mantido em níveis adequados, proporcionando a eliminação da infecção com o mínimo de dano ao hospedeiro. Para isso, a atuação das citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β torna-se imprescindível para o controle da doença (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003; BUENO et al., 2010). Neste sentido, um balanço delicado entre a resposta imunológica Th1 e Th2/Treg é necessário

para que ocorra a destruição do parasito sem desencadear complicações graves ao hospedeiro (GREENWOOD et al., 1972; GOONEWARDENE et al., 1990; GOOD et al., 2005; RILEY et al., 2006; LANGHORNE et al., 2008).

A resposta imune adquirida conta com a participação dos linfócitos T CD8⁺, que são ativados através da apresentação de antígenos via MHC I, atuando no desenvolvimento da atividade citotóxica sobre os hepatócitos infectados. Uma vez que eritrócitos não expressam MHC I, o papel das células T CD8⁺ na proteção contra a malária fica restrito a fase pré-eritrocítica (HOFFMAN et al., 1989; DOOLAN; HOFFMAN 2000; GOOD et al., 2005). Por outro lado, os linfócitos T CD4⁺ agem tanto na fase hepática, polarizando para o perfil de resposta Th1 através da secreção de IFN- γ , quanto no curso da infecção eritrocítica, pelo favorecimento da produção de anticorpos pelos linfócitos B (CLERICI; SHEARER, 1994; GOOD et al., 2005; SIDDIQUI et al., 2007).

A partir de experimentos de transferência passiva de anticorpos realizados na década de 60 e 70 foi demonstrado a importância dos anticorpos contra as formas sanguíneas do parasito. Anticorpos IgG totais de adultos infectados transferidos para crianças promoveu a diminuição da parasitemia. Após o esgotamento dos anticorpos a parasitemia voltou a crescer, retornando a níveis baixos após uma nova transferência (COHEN et al., 1961; COHEN et al., 1971; revisto por SABCHAREON et al., 1991). Especificamente, os anticorpos da subclasse IgG são os mais relevantes no combate a infecção malárica.

Na fase eritrocítica, os anticorpos podem atuar através de mecanismos distintos os quais envolvem ligação às células infectadas com consequente lise mediada pela ativação do sistema complemento, fagocitose e/ou citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCI) (revisto por PLEBANSKI; HILL, 2000). A ADCI é um processo que se inicia com a opsonização por anticorpos IgG de merozoítos liberados das hemácias que, por sua vez, ligam-se através de sua porção Fc a receptores Fc expressos na superfície de monócitos, os quais passam a liberar mediadores solúveis que irão inibir a divisão intraeritrocítica de parasitos circundantes (PÉRIGNON; DRUILHE, 1994; BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1995). As subclasses IgG1 e IgG3 classificadas como citofílicas, parecem ser as subclasses mais importantes de imunoglobulinas G no combate a infecção malárica uma vez que indivíduos que apresentam níveis reduzidos dessas subclasses parecem ser mais susceptíveis a infecção quando comparados àqueles que apresentam níveis elevados (revisto por GREEN; KRIER, 1978; HILL et al., 2013).

Uma expressiva resposta humoral, direcionada a vários antígenos plasmodiais, geralmente é observada em áreas altamente endêmicas. Isso ocorre devido ao constante estímulo proporcionado por repetidas exposições aos parasitos (WEISS et al., 2010) e está relacionada com a ativação de células B policlonais com consequente produção de anticorpos contra vários antígenos expressos pelo parasito em seus diversos estágios de desenvolvimento (MAYXAY et al., 2004).

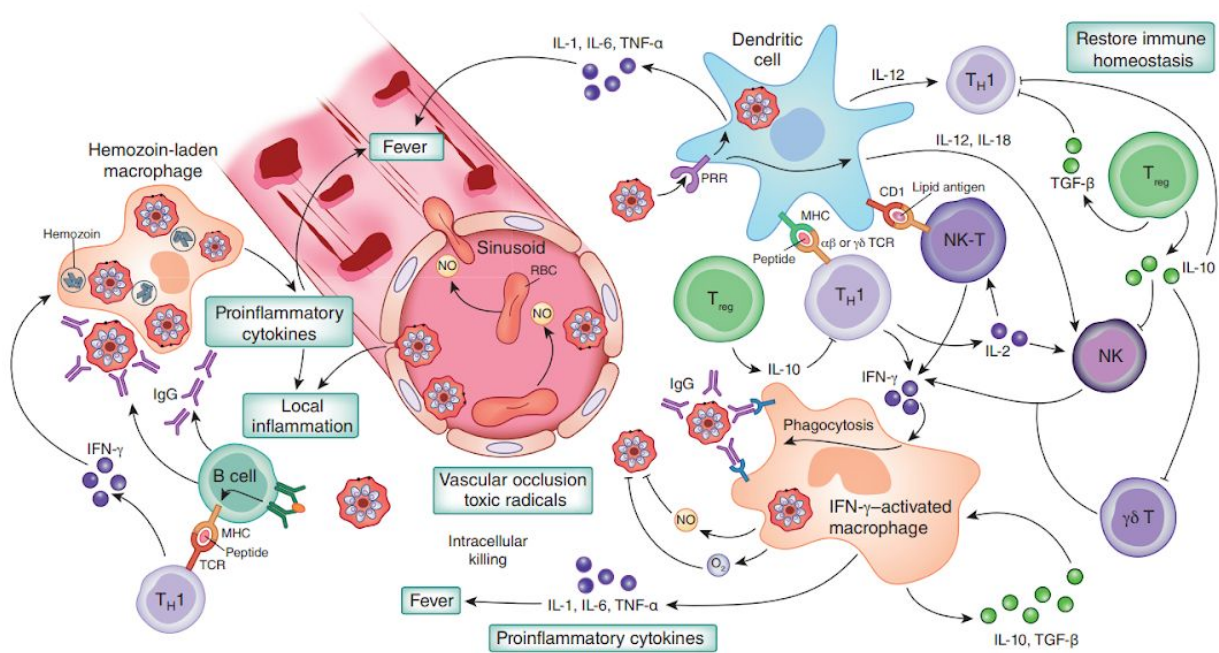


Figura 11: Resposta imune na fase eritrocítica da malária. Fonte: Riley; Stewart, 2013.

1.3.5. Modelo experimental de malária grave

Diante das dificuldades acerca do acompanhamento dos casos de malária humana e da limitada possibilidade de examinar os processos patológicos envolvidos, restrito à coleta proveniente de biópsias, fluidos corporais ou de autópsias, alguns modelos experimentais de malária foram desenvolvidos. Modelos murinos e de primatas não humanos (CRAIG et al., 2012) permitem um exame mais detalhado de processos fisiopatológicos causados pela infecção da malária, uma vez que há disponibilidade de diferentes ferramentas genéticas (animais *knockout*) e moleculares que facilitam a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença (DE SOUZA; RILEY, 2002; LAMB et al., 2006).

Quatro espécies de *Plasmodium* que infectam roedores murinos da África Central são utilizadas em laboratório em diversos modelos experimentais de malária. Estas espécies são

Plasmodium vinckei (Rodhain, 1952), *Plasmodium chabaudi* (Landau, 1965), *Plasmodium yoelii* (Landau, Michel e Adam, 1968) e *Plasmodium berghei* (Vincke e Lips, 1948).

Apesar de serem próximas filogeneticamente, existem pequenas diferenças entre os quatro parasitos da malária de roedores, por exemplo, diferenças na morfologia, tempo de desenvolvimento e tamanho das diferentes fases e isoenzimas (CARTER; DIGGS, 1977; CARLTON et al., 2002). Estas características variáveis influenciam nas interações parasita-hospedeiro e são responsáveis por diferenças no curso da infecção, virulência e patologia. Um exemplo disso exemplo é o nível de sincronidade da infecção no sangue. As espécies *P. chabaudi* e *P. vinckei* mostram o desenvolvimento síncrono de suas fases sanguíneas, enquanto as outras duas espécies apresentam infecções relativamente assíncronas em roedores de laboratório. Outro exemplo é a diferença na preferência por invadir diferentes populações de glóbulos vermelhos: enquanto *P. chabaudi* e *P. vinckei* invadem os glóbulos vermelhos imaturos e maduros, *P. berghei* e *P. yoelli* têm uma predileção marcada para os reticulócitos. No entanto, existem evidências de que diferentes isolados de *P. berghei* mostram diferenças significativas na preferência dos eritrócitos. Por exemplo, algumas linhagens do isolado NK65 têm uma preferência por reticulócitos em comparação com linhas do isolado ANKA em camundongos Swiss (CARTER; DIGGS, 1977; VANDERMOSTEN et al., 2018).

A maioria dos estudos que visam estudar a malária grave em modelo murino provém do modelo de infecção por *P. berghei*, que apresenta uma divisão segura entre linhagens de camundongos resistentes (BALB/c) e suscetíveis (C57BL/6j e CBA) (WHITE et al., 2010; CRAIG et al., 2012). Estudos demonstraram que camundongos geneticamente susceptíveis e infectados com a cepa ANKA podem apresentar manifestações clínicas semelhantes à malária por *P. falciparum*, em especial, os sintomas típicos da malária cerebral (coma, paralisia e convulsões), assim como alterações morfológicas cerebrais, como ativação de células endoteliais e micróglia, identificadas em portadores desta manifestação (MEDANA et al., 1997; VAN DER HEYDE et al., 2001). Em contrapartida, as linhagens resistentes exibem uma resposta diferencial ao parasito, não desenvolvem malária cerebral e morrem, devido à anemia grave e hiperparasitemia (GRAU et al., 1986; KOSSODO; GRAU, 1993). Entretanto, pouco se sabe sobre a infecção utilizando a cepa NK65 de *P. berghei*. Este é um aspecto importante a ser considerado, uma vez que tem sido amplamente estudado na malária humana e experimental o envolvimento do polimorfismo de cepas do parasito na determinação da

resposta imunológica e da patogênese da infecção (HEY, 1999). Estudos recentes têm associado a utilização da cepa NK65 no estudo da resposta inflamatória na malária cerebral (LACERDA-QUEIROZ et al., 2011) e mais frequentemente, no estudo da LPA/SDRA associada à malária (VAN DEN STEEN et al., 2010; CRAIG et al., 2012; SCACCABAROZZI et al., 2015).

Apesar da importância do modelo murino no entendimento da malária, torna-se necessário ter cautela quando se relaciona o modelo animal à doença humana. A extrapolação dos resultados obtidos no modelo experimental deve ser realizada com cuidado, pois estes apresentam diferenças significativas. No modelo murino, o leucócito é o tipo celular predominantemente sequestrado na microcirculação cerebral de camundongos, e não os eritrócitos, como na malária cerebral humana (NEILL; HUNT, 1992; GRAU et al., 1993; ADAMS et al., 2000). Portanto, a escolha da combinação hospedeiro/parasito é de extrema importância para validação dos resultados (GRAU; KOSSODO, 1994; CRAIG et al., 2012; DEROOST et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Infecções por *Ascaris* spp. afetam aproximadamente 800 milhões de pessoas no mundo atingindo altas taxas de endemicidade nas regiões tropicais (HOTEZ; KAMATH, 2009, PULLAN et al., 2014). O impacto é considerável e reflete em uma perda anual estimada de 1,31 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (disability-adjusted life years - DALYs) (HOTEZ et al., 2014; PULLAN et al., 2014). Apesar de ascaridose ser uma doença há muito tempo conhecida (LELES et al., 2008; OH et al., 2010), ainda apresenta grande relevância epidemiológica impactando negativamente a saúde pública de áreas endêmicas.

Estudos recentes têm demonstrado que o desenvolvimento da imunidade contra nematódeos gastrointestinais é concomitante com a modulação da resposta Th1 (MENDEZ et al., 2005; FUJIWARA et al., 2006; GEIGER et al., 2007; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2016), considerada crucial para o controle imunológico de inúmeras infecções virais, bacterianas ou por protozoários, como em infecções por *Plasmodium* spp., agentes etiológicos da malária (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2002; GOOD et al., 2005), que é uma das doenças parasitárias de maior importância global sendo responsável por altas taxas de morbidade e de mortalidade (PHILLIPS et al., 2017; WHO, 2017).

Nesse sentido, devido à importância da ascaridose e da malária na saúde pública em regiões tropicais, vários estudos têm relatado a ocorrência de indivíduos coinfectados por *Plasmodium* spp. e *Ascaris* spp. (DEGAREGE; ERKO, 2016). Desse modo, a influência da infecção por *Ascaris* spp. na aquisição de imunidade contra *Plasmodium* spp. foi proposta em vários estudos de campo. No entanto, os achados reais são controversos, impossibilitando concluir se o resultado desta interação é benéfica, neutra ou prejudicial ao hospedeiro (BROOKER et al., 2007; NACHER et al., 2011). Portanto, o entendimento da interação entre esses parasitos em modelo experimental, no que concerne os aspectos fisiopatológicos e imunobiológicos da coinfecção, poderiam contribuir para o conhecimento científico básico que poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias imunoproláticas e/ou de controle que visam combater as complicações provenientes da malária em áreas endêmicas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a fisiopatologia e o perfil imunológico da coinfeção experimental de *Ascaris suum*, durante a ascarirose larval, e *Plasmodium berghei* NK65.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Avaliar o curso da coinfeção experimental por *A. suum* e *P. berghei* NK65;

3.2.2. Determinar a carga parasitária de camundongos monoinfectados e coinfectados por *A. suum* e *P. berghei* NK65 em diferentes tempos de infecção;

3.2.3. Avaliar o perfil hematológico de camundongos monoinfectados e coinfectados por *A. suum* e *P. berghei* NK65 no sétimo dia pós infecção;

3.2.4. Identificar possíveis alterações histopatológicas do pulmão, fígado e baço de camundongos monoinfectados e coinfectados por *A. suum* e *P. berghei* NK65 no sétimo dia pós infecção;

3.2.5. Avaliar a função pulmonar e hepática de camundongos monoinfectados e coinfectados por *A. suum* e *P. berghei* NK65 no sétimo dia pós infecção;

3.2.6. Avaliar a atividade da N-acetilglicosaminidase de macrófagos, mieloperoxidase de neutrófilos e peroxidase de eosinófilos nos pulmões e fígado de camundongos monoinfectados e coinfectados por *A. suum* e *P. berghei* NK65 no sétimo dia pós infecção;

3.2.7. Determinar as populações leucocitárias e níveis de proteína exsudada e de hemoglobina nas vias aéreas de camundongos monoinfectados e coinfectados por *A. suum* e *P. berghei* NK65 no sétimo dia pós infecção;

3.2.8. Avaliar o perfil de citocinas teciduais de camundongos monoinfectados e coinfectados por *A. suum* e *P. berghei* NK65 no sétimo dia pós infecção;

4. METODOLOGIA

4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A manutenção e o uso de animais para a realização das atividades de pesquisa foram conduzidos de acordo com princípios éticos de boas práticas em experimentação animal, sendo que o projeto foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme certificado pelo Protocolo de nº. 21/2018 (anexo).

4.2. PARASITOS, ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1. *Ascaris suum*

Vermes adultos de *A. suum* foram doados por um abatedouro de suínos localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os vermes adultos fêmeas foram mantidos em tampão fosfato (PBS - pH 7,2) e levados para o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) da Universidade Federal de Minas Gerais para serem processados.

4.2.2. *Plasmodium berghei*

A cepa NK65 de *P. berghei* foi gentilmente fornecida pela Dra. Antoniana Ursine Krettli do Laboratório de Malária do Instituto René Rachou-FIOCRUZ/MG e foi mantida em camundongos BALB/c por passagens sanguíneas semanais no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP).

4.2.3. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6j machos, de sete semanas de idade, linhagem considerada susceptível à infecção por *Ascaris* spp. (LEWIS et al., 2007; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013) e por *Plasmodium berghei* NK65 (CRAIG et al., 2012; SHAN et al., 2012; STEPHENS et al., 2012; LOPES et al., 2016). Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), com boas condições de higiene, água e comida *ad libitum*, condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($60 \pm 10\%$) e luminosidade (ciclo claro-escuro 12 horas).

4.2.4. Delineamento experimental

Os camundongos foram divididos em quatro grupos: **Ni**, animais não infectados (grupo controle, n=18); **As**, animais monoinfectados por *A. suum* (n=27); **Pb**, animais monoinfectados por *Plasmodium berghei* cepa NK65 (n=27); **PbAs**, animais coinfectados por *A. suum* e *Plasmodium berghei* cepa NK65 (n=31). A coinfeção ocorreu de forma simultânea (t = 0). Uma parcela dos animais foi utilizada para observação da sobrevivência, sinais clínicos e avaliação da parasitemia (n= 15, para cada grupo de animais infectados e n= 6 para animais não infectados). Os animais utilizados nos demais procedimentos experimentais foram eutanasiados no sétimo dia pós infecção (figura 12).

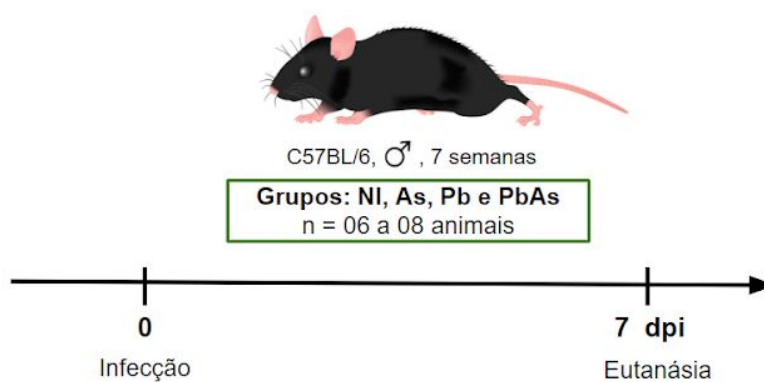


Figura 12: Delineamento experimental da coinfeção por *Ascaris suum* e *Plasmodium berghei* NK65.

4.3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

4.3.1. Embrionamento dos ovos de *Ascaris suum*

O embrionamento dos ovos de *A. suum* foi realizado conforme descrito por Gazzinelli-Guimarães et al. (2013). Os vermes adultos fêmeas foram separados, dissecados para retirada dos úteros e colocados em um cadinho de porcelana macerados mecanicamente para a liberação dos ovos. Em seguida, aos ovos foram adicionados cerca de 20 mL de PBS, homogeneizados e, por fim, purificados por filtração em tamis com telas de nylon de 100 µm. Ao conteúdo resultante da filtração, foi colocado em garrafas de cultura contendo 50 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ a 0,2 M) para o embrionamento dos ovos.

O embrionamento dos ovos foi induzido de acordo com metodologia descrita por Boes et al. (1998), modificado por Gazzinelli-Guimarães et al. (2013). Suspensões contendo 25 ovos/µL foram preparadas em garrafas de cultura com 50 mL com H₂SO₄ (0.2 M) e mantidos em estufas B.O.D. (SP 50 RDE 35 Super) a 26°C com oxigenação por agitação

manual três vezes por semana. Culturas de ovos com de aproximadamente 100 dias de incubação foram utilizadas para as infecções, uma vez que é o período de maior infectividade dos ovos (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013).

4.3.2. Preparo de ovos e infecção por *Ascaris suum*

No dia das infecções, uma alíquota da cultura de ovos de *A. suum* (em uma concentração de 25 ovos / μL em H_2SO_4 a 0,2 M) foi centrifugada por dez minutos, a 800 x g em temperatura ambiente (T.A.), para a posterior remoção do ácido. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em hipoclorito de sódio a 5 % e incubado em estufa a 37°C e 5% CO_2 por 2 horas (Water – Jacketed Incubator, Thermo Scientific, EUA). Após essa incubação, o hipoclorito foi removido da solução após pelo menos quatro ciclos de centrifugação por 10 minutos, a 800 x g, em T.A. com água filtrada. Após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em água filtrada e três alíquotas de 10 μL foram removidas da suspensão e usadas para a contagem de ovos larvados. O resultado obtido foi usado para calcular o número médio de ovos totalmente larvados por μL e determinar diluição necessária para obter uma suspensão contendo 2.500 ovos em 200 μL .

A infecção foi realizada por via intragástrica de acordo com protocolo descrito por Lewis et al. (2006). Basicamente, com o auxílio de uma agulha de gavage, foram inoculados 200 μL de uma suspensão contendo uma carga padrão de 2.500 ovos totalmente larvados, seguidos por 100 μL de água, seguindo o delineamento experimental estabelecidos para este estudo.

4.3.3. Manutenção de *Plasmodium berghei* NK65

Amostras criopreservadas de *P. berghei* cepa NK65 foram descongeladas em temperatura ambiente e posteriormente inoculadas via intraperitoneal em camundongos BALB/c. A seguir, a parasitemia sanguínea foi monitorada diariamente por meio da análise de esfregaços confeccionados a partir da veia caudal até atingir taxas acima de 30%. Então, foi realizada a coleta de sangue por exsanguinação do sinos retro-orbitais utilizando pipetas Pasteur capilar preparadas com o anticoagulante citrato de sódio. Aproximadamente 200 μL de sangue foram inoculados intraperitonealmente em outro animal. Esse procedimento foi realizado mais três vezes para garantir a virulência da cepa.

4.3.4. Infecção por *Plasmodium berghei* NK65

Após aquisição de virulência, foi realizada a coleta de sangue de camundongos BALB/c com parasitemia acima de 30% por exsanguinação do plexo retro-orbital utilizando uma pipeta Pasteur capilar. Em seguida, para o preparo do inóculo de infecção, foi realizada a contagem de eritrócitos totais em contador hematológico automatizado Bio-2900 Vet (Bioeasy, EUA) e a determinação da parasitemia através de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Animais C57BL/6j foram infectados intraperitonealmente com 10^4 eritrócitos parasitados por *P. berghei* NK65 em suspensão contendo PBS (GRAU et al., 1986; NEILL; HUNT, 1992).

4.4. AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA

Para avaliação do curso da coinfeção, a sobrevivência dos animais pertencentes aos grupos experimentais foi avaliada diariamente. Todos os animais foram acompanhados por um período de até 60 dias em que foram avaliados quanto ao peso, parasitemia de *Plasmodium berghei* e manifestação de sinais clínicos. O dia da morte espontânea de cada animal foi computado e a curva de sobrevivência foi construída segundo Kaplan-Meier. Para análise comparativa entre os grupos foi utilizado o teste Gehan-Breslow.

4.5. PROCEDIMENTOS DE ANESTESIA E EUTANÁSIA

Após o sétimo dia pós infecção foi realizada a eutanásia dos animais para a coleta do BAL, coleta de órgãos para análises histopatológica e dosagem de citocinas e determinação da carga parasitária de *A. suum*. Para tal, os camundongos receberam uma dose de anestésico (cetamina 390 mg/Kg / xilazina 27 mg/Kg) pela via intraperitoneal e, em seguida, foi realizada a eutanásia por hipovolemia através da coleta de sangue do plexo retro-orbital nos animais anestesiados. Todavia, para a avaliação da função pulmonar, os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de anestésico (ketamina 130 mg/Kg / xilazina 9 mg/Kg) para a manutenção da respiração espontânea e, posteriormente à essa avaliação, foi realizada a eutanásia dos animais por hipovolemia.

4.6. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE *Ascaris suum*

A quantificação da carga parasitária foi realizada através da recuperação das larvas nos pulmões e no fígado. Em síntese, após a eutanásia, os tecidos foram coletados, picotados extensivamente com tesoura e colocados em aparato de Baermann modificado, onde permaneceu incubado durante 4 horas na presença de PBS a 37°C. Após a incubação, o sedimento foi coletado com auxílio de pipetas Pasteur e transferidos para tubos cônicos de 15 mL que foram centrifugados por dez minutos, a 800 x g em T.A. Os sobrenadantes foram ressuspendidos em solução tamponada de formaldeído a 4%, homogeneizados e armazenados para posterior contagem em microscópio óptico.

4.7. DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE *Plasmodium berghei*

Para avaliação da parasitemia de *P. berghei*, uma gota de sangue foi coletada a partir da veia caudal, seguindo-se da confecção de esfregaços sanguíneos, secos ao ar, fixados com metanol e corados com solução recém diluída de Giemsa, na proporção de cinco gotas para cada 1 mL de água MilliQ. Após 25 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000x). A parasitemia foi determinada através da contagem do número de hemácias infectadas, em um total de 1.000 hemácias. A parasitemia foi expressa em porcentagem de hemácias parasitadas.

4.8. COLETA E PROCESSAMENTO DO SANGUE, ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO

Foram coletados 500 µL de sangue do plexo retro-orbital de cada camundongo utilizando uma pipeta Pasteur capilar. O sangue coletado foi transferido para tubos contendo o anticoagulante EDTA para análise hematológica. Posteriormente, foi realizada a centrifugação dos tubos para a coleta do plasma que foi armazenado a -80°C para análises posteriores. A contagem global de leucócitos foi realizada em contador hematológico automático Bio-2900 Vet (Bioeasy, EUA). Para a determinação do número relativo e absoluto de leucócitos, foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo, coradas por Panótico Rápido (Laborclin, Brasil) e, posteriormente, contadas em microscopia óptica. Para a determinação do número relativo de cada população celular: linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos, foi realizada pela a contagem diferencial de 100 células por

esfregação sanguíneo. O número absoluto de cada população celular foi calculado utilizando o número global de leucócitos.

4.9. ENSAIOS BIOQUÍMICOS

4.9.1. Avaliação da atividade enzimática AST e ALT - função hepática

Como parâmetro clínico de avaliação de lesão hepatocelular foi determinada a concentração em U/L de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) plasmática através da adaptação do kit comercial AST Bioclin (Bioclin Quibasa, Brasil) e ALT Bioclin (Bioclin Quibasa, Brasil). O volume de plasma empregado foi 10 µL para cada ensaio.

4.10. CARACTERIZAÇÃO DA FISIOPATOLOGIA DA COINFEÇÃO

4.10.1. Obtenção, processamento e análise do lavado broncoalveolar (BAL)

Após a eutanásia, foi realizada em cada animal, dissecação traqueal e pequena incisão na parte superior da traqueia para introdução de um cateter (Safety Catheter 18G x 1¼", Termo Medical Corp.) acoplado a uma seringa. Para obter o BAL foram realizadas duas lavagens intratraqueais com duas alíquotas de 1 mL de PBS filtrado a 4°C. O líquido recuperado, num volume final de 2 mL, foi imediatamente passado em filtros de 40 µm de diâmetro (BD Biosciences, EUA) para remoção das larvas presentes no lavado e recolhido em um tubo, previamente identificado. Em seguida, o filtrado foi submetido à centrifugação a 300 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e congelado a -80°C para a quantificação de proteína total e hemoglobina. Posteriormente, o sedimento do BAL resultante do processamento, foi suspenso com 100 µL de PBS contendo 3 % albumina sérica bovina (BSA). Uma alíquota foi removida para obtenção da contagem global de células, sendo o resultado usado para ajustar o volume de cada amostra de forma a conter 5x10⁴ células / mL. O volume ajustado foi, então, centrifugado por cinco minutos, a 135 x g e 4°C (Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge). Lâminas obtidas após citocentrifugação foram coradas por Panótico Rápido (Laborclin, Brasil) e usadas para a contagem diferencial de leucócitos. Em cada lâmina foram contadas 400 células e o número relativo de cada subtipo celular (linfócitos, monócitos/macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) foi determinado. Larvas retidas no filtro celular, durante processamento foram recuperadas

pela lavagem dos filtros com 10 mL de PBS seguido de centrifugação por 10 minutos a 800 x g em T.A. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso com 10 mL de solução tamponada de formaldeído a 4% e armazenado para posterior contagem em microscópio óptico, do número de larvas recuperadas nas vias aéreas.

As concentrações das proteínas totais presentes no BAL foram determinadas pelo método do ácido bicinrônico usando kit comercial (Pierce, EUA) e seguindo as instruções do fabricante. Uma curva padrão foi realizada usando BSA e os valores de densidade óptica (O.D.) das amostras foram interpolados para se determinar a concentração de proteínas nas mesmas. Os resultados foram expressados por μg de proteína total por mL de BAL.

A concentração de hemoglobina presente no BAL foi dosada por ensaio colorimétrico usando o método cianometahemoglobina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm utilizando solução de Drabkin modificada (Bioclin Quibasa, Brasil). O padrão de hemoglobina (Bioclin Quibasa, Brasil) foi usado para preparação de uma curva padrão na qual foram interpolados os valores de O.D. das amostras para se determinar a concentração das mesmas (GUABIRABA et al., 2013). O teor de hemoglobina foi expresso em g de Hb por dL de BAL.

4.10.2. Avaliação da função pulmonar: espirometria

A avaliação da função e fisiologia pulmonar em camundongos infectados e coinfetados foi realizada por espirometria no Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica ICB/UFMG. Basicamente, os camundongos foram anestesiados via subcutânea (cetamina 130 mg/Kg / xilazina 09 mg/Kg) para manutenção da respiração espontânea, em seguida, os animais foram traqueostomizados. Para tanto, a traqueia foi exposta removendo-se, cuidadosamente, a glândula submaxilar e a camada muscular que envolve a traqueia e uma pequena incisão foi feita para permitir a entrada do cateter de teflon (1,7 mm de diâmetro e 0,8 mL de espaço morto) e os animais foram colocados em um pletismógrafo conectado a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, USA).

Este aparelho laboratorial, especificamente projetado para uso em camundongos, tem apenas um volume de cânula (espaço mortal) de 0,8 mL e fornece semi-automaticamente três manobras diferentes: manobra de pressão, volume quasi-estático e fluxo rápido. Uma vez no pletismógrafo, os animais foram submetidos a uma frequência respiratória média de 160

inspirações/minuto até alcançarem um padrão regular de inspiração e expiração (VANOIRBEEK et al., 2010).

Durante a respiração mecânica, na função RC foram detectadas a complacência dinâmica (C_{dyn}) e resistência (RI). Para medir a capacidade vital forçada (FVC) e a capacidade inspiratória (IC), foi realizada a manobra de pressão-volume quasi-estática, que infla os pulmões para uma pressão padrão de +30 cm H_2O e depois exala lentamente até uma pressão negativa de -30 cm de H_2O . A complacência quasi-estática (de 0 a +10cm H_2O) foi calculada com esta manobra considerando o volume/pressão da expiração. Nas manobras rápidas de fluxo-volume, os pulmões foram inflados até +30 cm H_2O (TLC) e, imediatamente, a pressão foi diminuída para -30cm H_2O até atingir a sua capacidade residual. O volume expiratório forçado (FEV) foi registrado durante esta manobra. Por fim, o índice de Tiffeneau foi obtido através da razão (FEV50/FVC). Todas as manobras subótimas foram rejeitadas e, para cada teste realizado em cada animal, pelo menos três manobras aceitáveis foram realizadas para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos. Após a realização da avaliação da função pulmonar por meio da espirometria, os animais foram eutanasiados por hipovolemia, como descrito anteriormente e, o tecido pulmonar coletado para posteriores análises.

4.10.3. Avaliação histopatológica dos pulmões, fígado e baço

Após a retirada dos pulmões, fígado e baço, as amostras foram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 4% tamponado (Synth, Brasil) por até sete dias. Posteriormente, as amostras foram gradualmente desidratadas em etanol, diafanizadas no xilol e incluídas em blocos de parafina, e em seguida obtidos cortes de 4 μm de espessura com os quais foram montadas lâminas histopatológicas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análises histopatológicas.

Para avaliar a intensidade da inflamação e da hemorragia pulmonar, foi calculado o grau de espessamento dos septos interalveolares. Vinte imagens aleatórias foram capturadas com a objetiva de aumento 20x, compreendendo uma área de $3,2 \times 10^6$ mm^2 de pulmão analisado. Os tecidos foram analisados utilizando o software KS300 acoplado a um analisador de imagem Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha), em que foram selecionados todos os pixels do tecido pulmonar na imagem real foram selecionados para criação de uma

imagem binária, processamento digital e cálculo da área em mm² do septo interalveolar (NOGUEIRA et al., 2016).

Para análise do grau de inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular, inflamação do parênquima, e presença de hemorragia dos pulmões, foi feita análise semiquantitativa seguindo metodologia descrita previamente por Gazzinelli-Guimarães et al., 2018, cujo método baseia-se no *score* de 6 graus de diferenciação para inflamação das vias aéreas sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno das vias aéreas (ausente); grau 1 algumas vias aéreas possuem um pequeno número de células (discreto); grau 2 algumas vias respiratórias possuem inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria das vias aéreas possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4 a maioria das vias aéreas estão significativamente inflamadas (intensa); grau 5 todas as vias aéreas estão completamente inflamadas (grave). Para o *score* de inflamação perivascular, também foram utilizados 6 graus de diferenciação sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno dos vasos (ausente); grau 1 alguns vasos possuem um pequeno número de células inflamatórias (discreta); grau 2 alguns vasos possuem inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria dos vasos possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4 a maioria dos vasos estão significativamente inflamados (intenso); grau 5 todos os vasos estão completamente inflamados (grave). Do mesmo modo, o *score* para inflamação do parênquima pulmonar foi baseado em 6 graus sendo: grau 0 igual a menos que 1% do parênquima afetado; grau 1 de 1 a 9% do parênquima afetado; grau 2 de 10 a 29% do parênquima afetado; grau 3 de 30 a 49% do parênquima afetado; grau 4 de 50 a 69% do parênquima afetado; grau 5 mais de 70% do parênquima afetado. Já para o *score* das áreas hemorrágicas do tecido pulmonar foi baseado em 4 graus sendo: grau 0 ausência de hemorragia (ausente); grau 1 presença de pequenas zonas hemorrágicas (discreta); grau 2 presença de áreas hemorrágicas significativas (moderada); grau 3 presença de áreas hemorrágicas exuberantes (intensa).

A gravidade da lesão hepática foi avaliada através de *score* baseado em 5 graus para lesão do parênquima hepático: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno dos hepatócitos, vasos sanguíneos, ductos biliares e capilares (ausente); grau 1 regiões do parênquima hepático com pequeno número de células inflamatórias (discreta); grau 2 parênquima hepático apresentando infiltrado inflamatório difuso e infiltrado inflamatório perivascular, em torno dos ductos e pequenas zonas de necrose dispersas pelo parênquima (moderada); grau 3 parênquima hepático apresentando infiltrado inflamatório difuso e

infiltrado inflamatório perivascular, em torno dos ductos e extensas zonas de necrose dispersas pelo parênquima (acentuada); grau 4 parênquima hepático apresentando infiltrado inflamatório difuso e multifocal, células de Kupffer hiperplásicas e com presença de hemozoína, congestão de capilares sinusóides e presença de zonas de necrose (intensa).

Nos cortes histológicos do baço foi realizada somente a descrição histopatológica.

4.11. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

4.11.1. Dosagem de citocinas teciduais

Para a avaliação do perfil de citocinas no tecido pulmonar, 100 mg de tecido pulmonar foram homogeneizados (TissueLyser LT - Qiagen, Hilden, Alemanha) em 1.000 μ L de PBS tamponado com fosfato (0,4 M de NaCl e 10 mM de NaPO_4) suplementado 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina de soro bovino e inibidores de proteases (0,01 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila - PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina A). Os homogenatos foram centrifugados a 8.000 xg, durante 10 minutos em 4°C e o sobrenadante utilizado para dosagem das citocinas.

A produção de IL-1 β , IFN- γ , IL-12/IL-23p40, IL-6; IL-17A, IL-13, IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β foram dosadas utilizando kit de ELISA sanduíche (R&D Systems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax ELISA (Molecular Devices, EUA) em um comprimento de onda de 492 nm. Densidades ópticas (O.D.) foram obtidas e a concentração de citocinas (pg/mL) de cada amostra foi calculada a partir da interpolação dos valores de O.D. em uma curva padrão ajustada por uma equação de cinco parâmetros logísticos (5-PL).

4.11.2. Quantificação da atividade de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos no tecido pulmonar

A avaliação da atividade N-acetilglicosaminidase de macrófagos (NAG), mieloperoxidase de neutrófilos (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO) foi realizada nos homogenatos dos pulmões e foram mensuradas de acordo com um método descrito por Strath (1985) e modificado por Silveira (2002). Após a homogeneização do tecido (TissueLyser LT - Qiagen, Hilden, Alemanha), o homogenato foi centrifugado a 1500 x g durante 10 minutos a 4 °C e o sedimento resultante foi examinado para determinar a atividade de EPO, MPO e NAG.

Para o ensaio de atividade da N-acetilglicosaminidase tecidual (NAG), o sedimento foi homogeneizado em 950 μL de PBS e 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma Chemical Co, EUA) depois de congelados e descongelados três vezes usando nitrogênio líquido. O lisado foi então centrifugado (1500 x g, 4 ° C, 10 min) e o sobrenadante foi distribuído (100 μL / poço) numa microplaca de 96 poços (Corning, EUA). A reação foi iniciada com a adição de 100 μL do substrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma Chemical Co, EUA) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, 0,1 M Na_2HPO_4 , pH 4,5) na concentração final de 2,24 mM e incubação a 37 °C por 30 minutos. A reação foi terminada pela adição de 100 μL de tampão glicina 0,2 M (glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH, pH 10,6) e a absorbância foi determinada a 405 nm. O conteúdo dos macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão baseada na expressão da atividade de NAG feita de ensaio de macrófagos peritoneais estimulados com 3% de tioglicolato (dados não mostrados).

Para o ensaio MPO, o sedimento foi homogeneizado em 200 μL de solução de tampão 1 (NaCl 0,1M, Na_3PO_4 0,02M, Na_2EDTA 0,015M, pH 4,7) seguido de centrifugação (1500 x g, 4 ° C, 10 min). O sobrenadante foi descartado, em seguida adicionado ao sedimento 800 μL de solução tampão 2 (0,05 M NaPO_4 , brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5%), a mistura foi homogeneizada e depois congelada e descongelada três vezes utilizando nitrogênio líquido. O lisado foi centrifugado novamente (1500 xg, 4°C, 10 minutos), o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para a realização do ensaio, 25 μL da solução foram distribuídos em cada poço em microplacas de 96 poços (Corning, EUA) seguido pela adição de 25 μL de substrato TMB (3,3'-5,5, - tetrametilbenzina + dimetilsulfóxido 1,6 mM) e 100 μL de 0,5M H_2O_2 . Após a incubação durante cinco minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 1M). A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax ELISA (Molecular Devices, EUA) em um comprimento de onda de 450 nm.

Para o ensaio de EPO, o sedimento foi homogeneizado em 950 μL de PBS e 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma Chemical Co, EUA) e depois congelado e descongelado três vezes utilizando nitrogênio líquido para a lise de vesículas. O lisado foi então centrifugado (1.500 g, 4 ° C, 10 min) e o sobrenadante foi distribuído (75 μL / poço) numa microplaca de 96 poços (Corning, EUA), seguida da adição de 75 μL de substrato (1,5 mM OPD e 6,2 mM de H_2O_2 em 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0). Após a incubação durante 30

minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 50 μL de H_2SO_4 1 M e a absorbância foi determinada a 492 nm.

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a distribuição dos dados, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk. Para análise entre dois grupos foram utilizados o Test T de Student para dados paramétricos e Mann-Whitney U para dados não paramétricos. Para análises de variâncias entre três ou mais grupos, com apenas uma variável qualitativa, os testes One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey (dados paramétricos), ou os testes de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns (dados não paramétricos). Para análises de variâncias três ou mais grupos, com duas ou mais variáveis qualitativas, foram utilizados os testes de Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR *Plasmodium berghei* NK65

Devido às divergências encontradas na literatura acerca das linhagens das espécies de plasmódios utilizadas em diversos modelos experimentais, fez-se necessário a caracterização do modelo de infecção malárica utilizado neste trabalho. Neste capítulo, serão descritos aspectos clínicos, fisiopatológicos e imunobiológicos encontrados na infecção precoce e tardia por *P. berghei* NK65 nos tempos de sete e vinte dias pós-infecção, respectivamente.

5.1.1. Animais infectados por *Plasmodium berghei* NK65 tem sobrevida menor está associado ao aumento progressivo da parasitemia

A infecção por *P. berghei* NK65 desenvolveu-se de forma aguda com curso letal. A mortalidade foi expressa como percentagem de sobrevida, tendo início no nono dia pós-infecção e perdurou até o vigésimo nono, com um pico no vigésimo quarto dia pós-infecção (figura 13).

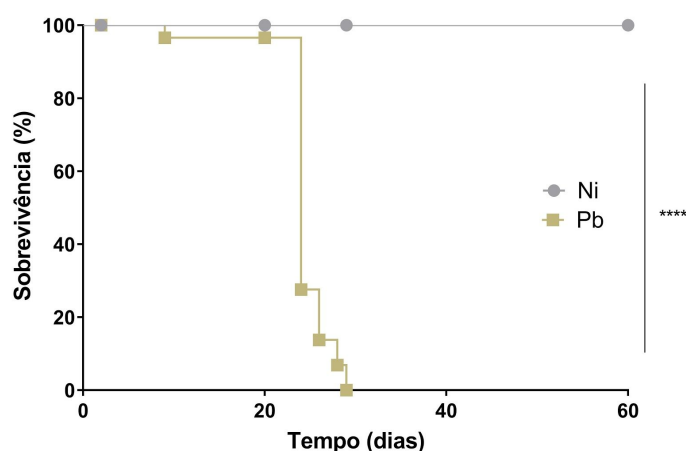


Figura 13: Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65. Os animais foram monitorados diariamente a partir da infecção. Para análise estatística foi utilizado o teste Gehan-Breslow e **** indica diferença significativa ($p < 0.0001$) na sobrevida entre os grupos. ($n=6$ para animais não infectados (Ni) e $n=15$ para animais infectados por *Plasmodium berghei* NK65 (Pb)).

A análise de variação da massa corporal dos animais foi mensurada em animais não infectados (controle) e infectados, ao longo do tempo (figura 14). Os animais infectados apresentaram uma perda de massa acentuada ao longo da infecção, cujo início se deu a partir

décimo sexto dia pós-infecção, um quadro que persiste até o vigésimo dia, enquanto que animais do grupo controle apresentaram um aumento contínuo da massa corporal ao longo das observações.

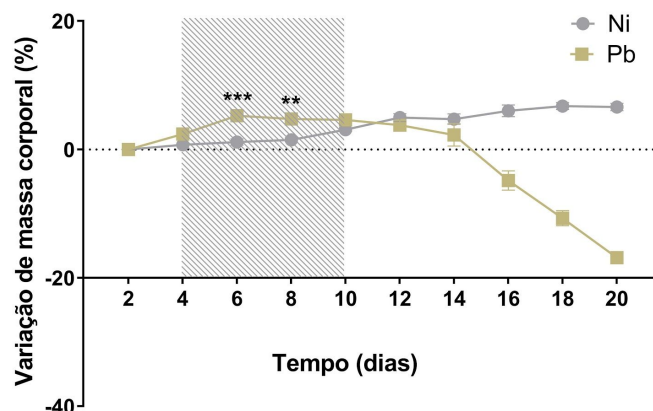


Figura 14: Variação da massa corporal (%) de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65. A área hachurada representa os tempos que foi possível a análise estatística dos dados. O teste One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e os resultados significativos são representadas por (*) nos gráficos, onde ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

Durante as observações diárias, foi notável o agravamento de outros sinais clínicos a partir do décimo quinto dia pós-infecção, como: pêlos arrepiados, palidez, tremulação corpórea. Por volta do vigésimo dia pós-infecção, os animais infectados apresentam-se notadamente prostrados, com motilidade reduzida e postura encurvada. A observação das vísceras dos camundongos infectados durante a necropsia evidenciou a presença de hepatoesplenomegalia, apresentando-se mais avançada no vigésimo dia pós-infecção, em que também foi possível observar a coloração enegrecida de órgãos como pulmão, fígado e baço, sugerindo deposição de pigmento malárico.

Ainda na caracterização clínica da infecção, ao avaliar o perfil hematológico, foi possível detectar uma diminuição expressiva do número de hemácias e hemoglobina nos animais no vigésimo dia de infecção (tabela 2), caracterizando um perfil de anemia grave. No entanto, não foi possível obter a leitura dos leucócitos nesses animais. Tal fato está associado à diminuição expressiva dos leucócitos no sangue verificado na visualização do esfregaço sanguíneo (figura 15). Outrossim, não houve variação na contagem de leucócitos durante a fase inicial da infecção. Quanto a contagem de plaquetas, é possível evidenciar a diminuição significativa no grupo infectado no sete dias pós infecção em relação ao grupo controle. Não

foram observadas diferenças significativas do número de plaquetas no grupo com vinte dias de infecção (tabela 2).

Tabela 2. Análise de hemograma de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65

	Grupos		
	Ni	Pb 7dpi	Pb 20dpi
Eritrócito (x 10⁶/μL)	8,47 ± 0,60	7,47 ± 0,92 ^a	1,05 ± 0,33 ^{a,b}
Hemoglobina (g/dL)	16,18 ± 1,10	14,17 ± 1,72 ^a	2,93 ± 0,83 ^{a,b}
Plaqueta (x 10³/μL)	320 ± 133	111 ± 37 ^a	199 ± 119,79

O teste One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média ± DP e os resultados significativos ($p \leq 0,05$) relacionadas aos grupos Ni e Pb7dpi são representadas por (a) e (b), respectivamente. (n=6 para animais não infectados (Ni) e infectados por *Plasmodium berghei* NK65 7dpi (Pb 7dpi) e n=8 para animais infectados por *Plasmodium berghei* NK65 20dpi (Pb 20dpi)).

A evolução da parasitemia foi acompanhada através de esfregaços sanguíneos, em dias alternados, a partir do segundo dia pós-infecção. A observação microscópica dos esfregaços sanguíneos confirmou a infecção em todos os animais, que desenvolveram aumento gradual de parasitemia ao longo do tempo (figura 15-A), coincidindo com o agravamento dos sinais clínicos e consequente mortalidade dos animais. Diferentes formas evolutivas de *P. berghei* NK65 foram visualizadas nos esfregaços sanguíneos analisados. Trofozoítos jovens e maduros e esquizontes foram detectados no esfregaço. Ao longo da infecção, percebe-se a preferência da cepa para invadir reticulócitos (figura 15-B, C e D).

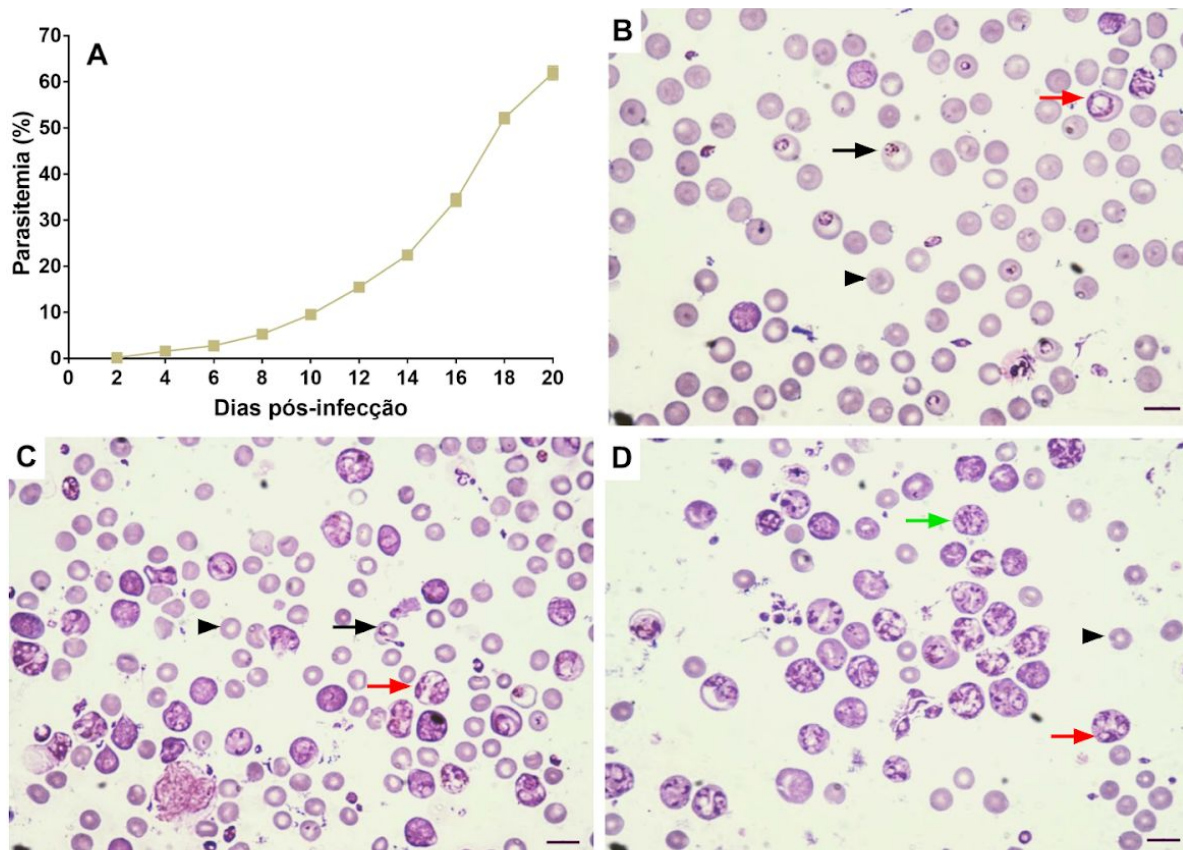


Figura 15: Curva de parasitemia e fotomicrografias de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, dos camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65. A) Média das parasitemias diárias de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65, a partir do segundo dia pós-infecção. B) Parasitemia leve, com 10% de hemácias parasitadas. C) Parasitemia moderada, com 30% de hemácias parasitadas. D) Parasitemia acentuada, com 65% de hemácias parasitadas. Os achados nos esfregaços sanguíneos estão representados por símbolos nas imagens, sendo que as cabeças de seta indicam eritrócitos não infectados e as setas indicam eritrócitos infectados, em que é possível ver formas evolutivas do parasito como trofozoíto jovem (seta preta), trofozoíto maduro (seta vermelha), esquizonte (seta verde). A parasitemia foi determinada através da contagem de eritrócitos infectados em um total de 1.000 eritrócitos. Barra = 10 μ m.

5.1.2. Animais infectados por *Plasmodium berghei* NK65 possuem hipertrofia e hiperplasia esplênica

Ao realizarmos as análises histopatológicas no baço dos camundongos infectados (figura 16), foi possível verificar, já ao sétimo dia pós-infecção, a presença de hipertrofia e hiperplasia na maioria dos nódulos linfáticos com proliferação das regiões B e T dependente, evidenciada pela ativação de centro germinativo (figura 16-B). Também foi possível demonstrar a presença de macrófagos nos nódulos linfáticos contendo citoplasma com depósitos de substância de coloração acastanhada sugerindo presença de hemozoína (pigmento malárico). Frequentemente também foi possível observar a deposição de pigmento de mesma característica no interstício da polpa vermelha. Além disso, identificamos o

aumento do número de megacariócitos que se encontravam dispersos aleatoriamente pela polpa vermelha em relação ao grupo controle.

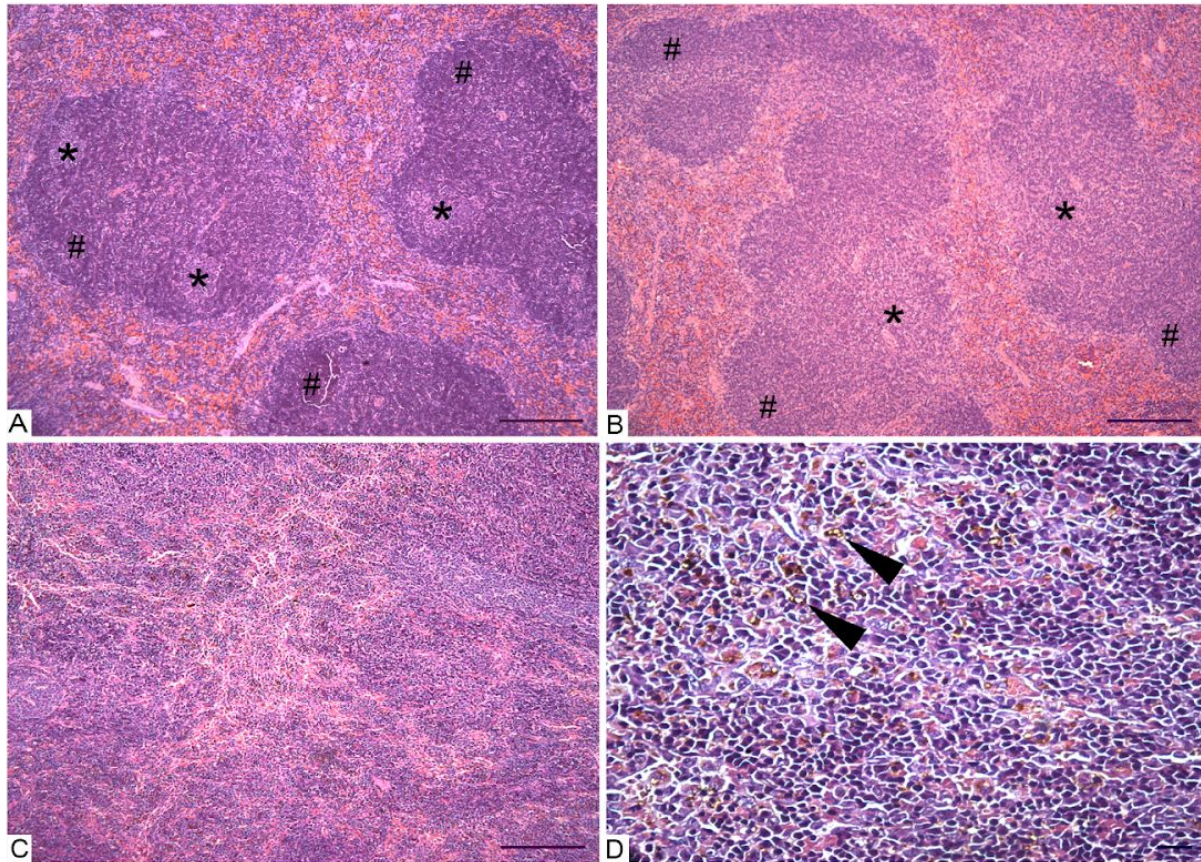


Figura 16: Fotomicrografia do baço de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. A) Imagem panorâmica do parênquima esplênico do grupo Ni evidenciando região T dependente (*) e B dependente (#). B) Imagem panorâmica do parênquima esplênico do grupo Pb7dpi com proliferação da região T dependente (*) e B dependente (#). C) Imagem panorâmica do parênquima esplênico do grupo Pb20dpi com perda dos limites nódulos linfóides e polpa vermelha. D) Imagem em maior aumento representativa do grupo Pb20dpi com presença de macrófagos exibindo pigmento malárico em seu citoplasma (cabeça de seta). Coloração hematoxilina & Eosina. Barra de escala da menor ampliação = 100 μ m. Barra de escala da maior ampliação = 20 μ m.

Após vinte dias de infecção, foi possível constatar grande alteração da arquitetura tecidual esplênica, com aumento da celularidade, bem como uma perda dos limites entre os nódulos linfóides e a polpa vermelha, revelando aumento da ativação celular através de antígenos liberados pelo parasito (figura 16-C). As zonas marginais claras que envolvem os folículos comuns em baços de camundongos não infectados desapareceram. Na região da polpa vermelha, foi notável o aumento no número de macrófagos, que frequentemente apresentavam o pigmento malárico em seu citoplasma (figura 16-D). Não foi evidenciado presença significativa de megacariócitos na fase tardia da infecção.

5.1.3. A infecção experimental por *Plasmodium berghei* NK65 provoca lesão no fígado e comprometimento da função hepática

Na análise histopatológica semiquantitativa do fígado, foi notável a progressão significativa de áreas lesionadas e da inflamação nos animais infectados quando comparado ao grupo controle (figura 17).

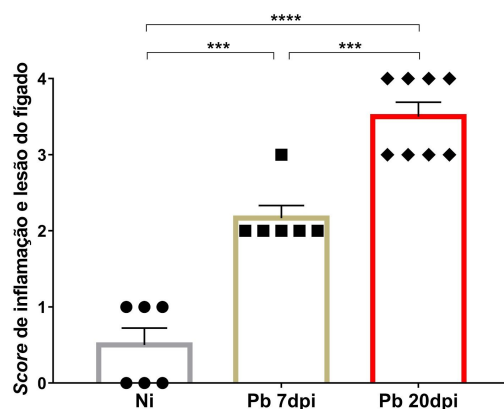


Figura 17: Avaliação semiquantitativa da inflamação e lesão hepática dada por *score* de inflamação e lesão de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e no vigésimo dia pós-infecção. O teste One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média ± SEM e os resultados significativos são representadas por (*) nos gráficos. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

A confirmação desse dado foi feita através da análise microscópica do parênquima hepático, em que foi possível identificarmos a presença discreta a moderada de um infiltrado inflamatório linfocitário difuso no sétimo dia pós-infecção (figura 18-B), que logo evoluiu apresentando maiores áreas de infiltrado inflamatório linfocitário, de forma difusa e multifocal. Também foi possível evidenciarmos na fase tardia da infecção, a presença frequente de células de Kupffer contendo pigmento malárico. Frequentemente também foi encontrado hemozoína depositada no parênquima hepático. Os capilares sinusóides se apresentavam congestionados e alguns hepatócitos encontram-se com o citoplasma com aspecto granuloso, rendilhado, tamanho aumentado, núcleo central de tamanho normal caracterizando degeneração hidrópica. Em alguns animais deste grupo foi encontrado pequenas zonas de necrose.

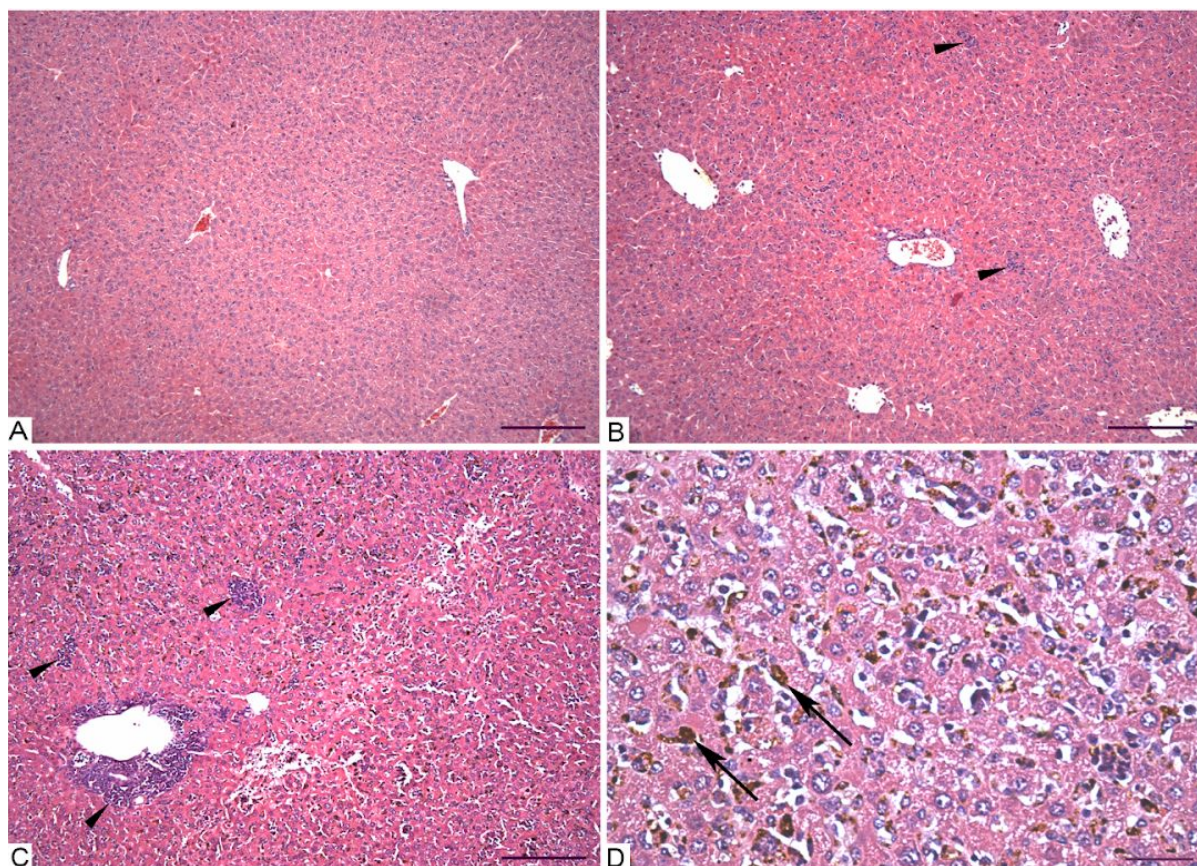


Figura 18: Fotomicrografia do fígado de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. A) Imagem panorâmica do parênquima hepático do grupo Ni. B) Imagem panorâmica do parênquima hepático do grupo Pb7dpi com presença de infiltrado inflamatório (cabeças de seta). C) Imagem panorâmica do parênquima hepático do grupo Pb20dpi com presença de infiltrado inflamatório (cabeças de seta). D) Imagem em maior aumento representativa do grupo Pb20dpi com presença de células de Kupffer contendo pigmento malárico (setas). Coloração hematoxilina & Eosina. Barra de escala da menor ampliação = 100 μ m. Barra de escala da maior ampliação = 60 μ m.

A fim de investigar se houve modificações funcionais oriundas da injúria hepática provocada pela infecção, determinamos a concentração plasmática das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que são importantes marcadores de lesão dos hepatócitos. Os resultados desta análise sugerem que, de fato, a infecção por *P. berghei* NK65 induz comprometimento gradativo da função hepática nos animais infectados, expressa pelas detecções significativamente maiores dessas enzimas no plasma de animais infectados com vinte dias (figura 19-A e B).

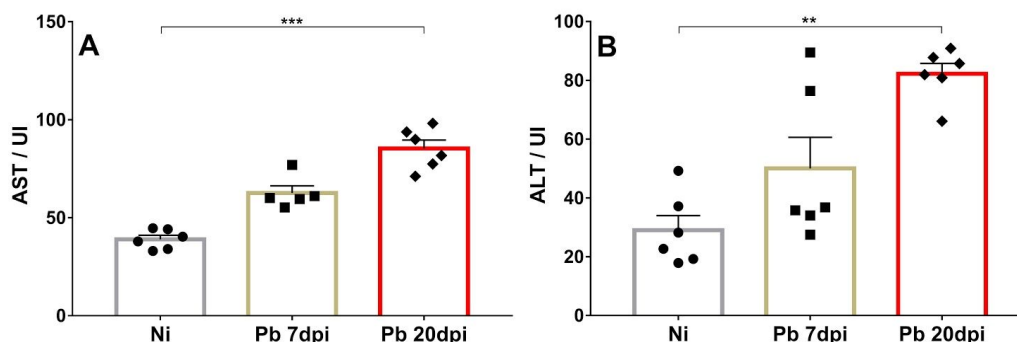


Figura 19: Enzimas hepáticas dosadas em camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. A) Níveis de AST. B) Níveis de ALT. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Ao analisarmos a atividade celular no fígado, verificamos um aumento significativo da atividade N-acetilglicosaminidase de macrófagos e peroxidase de eosinófilos no vigésimo dia pós-infecção (figura 20-A e C). No entanto, não foram observadas diferenças significativas em relação à atividade mieloperoxidase de neutrófilos (figura 19-B).

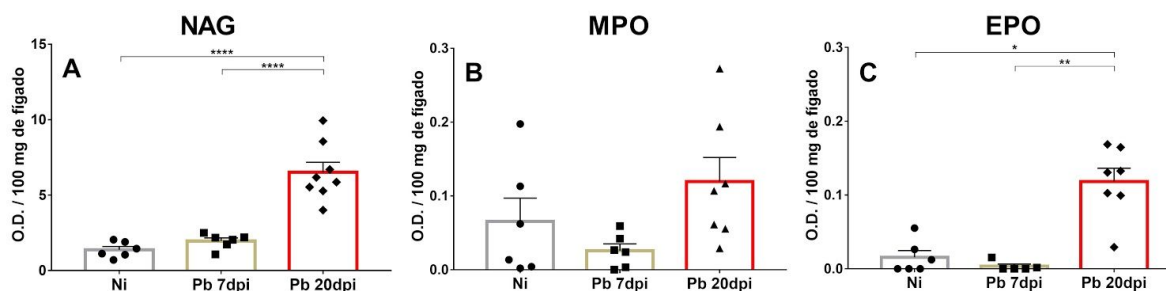


Figura 20: Níveis da atividade de NAG, MPO e EPO no tecido hepático de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. A) Níveis da atividade NAG. B) Níveis da atividade de MPO. C) Níveis da atividade de EPO. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.1.4. A infecção experimental por *Plasmodium berghei* NK65 induz lesão dos pulmões e comprometimento da função pulmonar e isso está associado ao aumento da produção de citocinas de perfil Th1

Ao realizarmos a análise histopatológica quantitativa do pulmão, constatamos que o espessamento dos septos interalveolares dos animais infectados por sete dias é significativamente maior quando comparados aos animais não infectados, no entanto, não houveram diferenças significativas na fase tardia da infecção (figura 21).

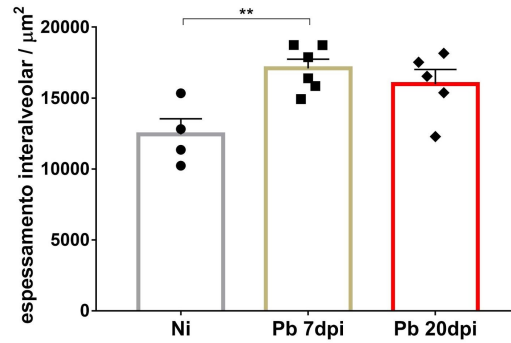


Figura 21: Área de espessamento interalveolar do pulmão de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. ** $p < 0,01$.

A avaliação por meio da análise histopatológica semiquantitativa, possibilitou observar diferenças significativas no grau de inflamação pulmonar dos animais infectados, mais evidente nos camundongos com vinte dias de infecção quando comparados ao grupo controle (figura 22-E). Nesses animais, foi constatado o aumento significativo das áreas de inflamação peribrônquica (figura 22-A), perivascular (figura 22-B), e no parênquima pulmonar (figura 22-C), mas não de hemorragia, que só foi aumentada no sétimo dia pós-infecção, ainda que não atingiu valores significativos (figura 22-E).

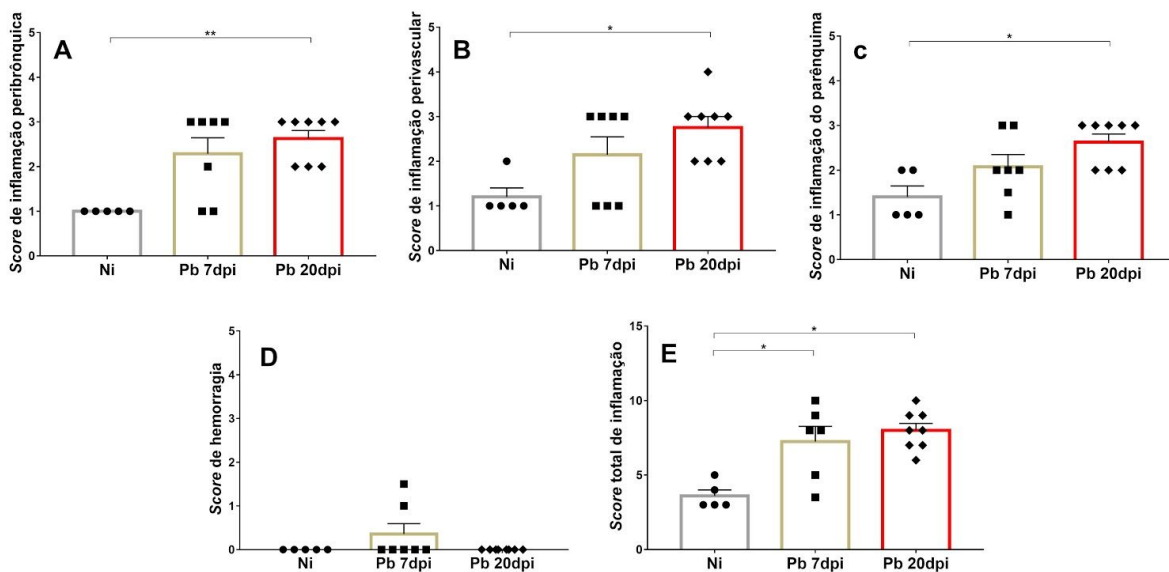


Figura 22: Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por *score* de inflamação e hemorragia de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. A) Inflamação das vias aéreas. B) Inflamação vascular. C) Inflamação do parênquima. D) Hemorragia. E) *Score* total de inflamação. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os

resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A análise microscópica do parênquima pulmonar confirmou a presença de um moderado infiltrado inflamatório linfocitário difuso pelo parênquima, com alguns vasos apresentando edema perivascular, na fase inicial da infecção (figura 23- B). Também foi observado a presença marcante de fenômenos exsudativos como pequenas zonas hemorrágicas e hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio dos brônquios e bronquíolos. Já no vigésimo dia pós-infecção, o infiltrado inflamatório era mononuclear composto predominantemente por linfócitos e macrófagos apresentando-se de forma difusa (figura 23-C e D). Também foi evidenciado a presença de pigmento malárico e de pequenos focos de hemorragia. Não constatamos a presença de Tecido linfoide Associado ao Brônquio (BALT) em ambas as fases da infecção.

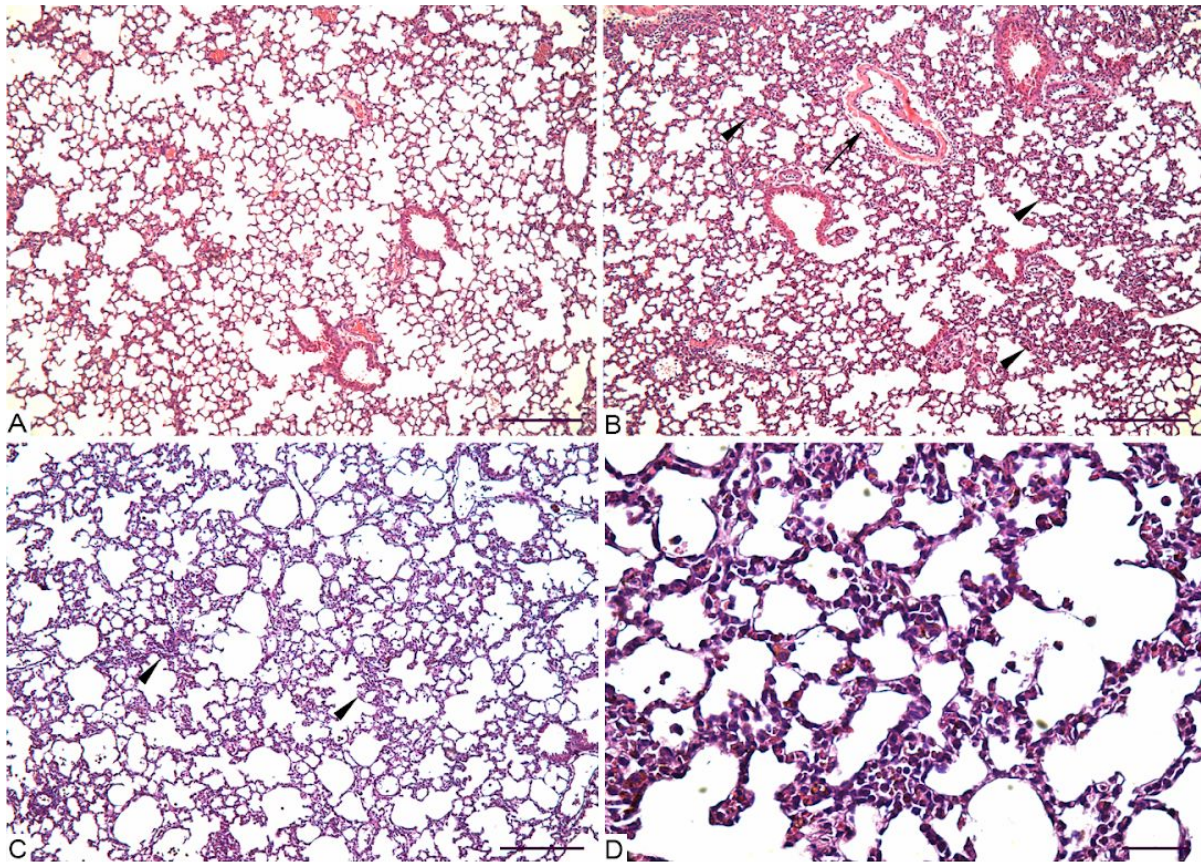


Figura 23: Fotomicrografia do pulmão de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. A) Imagem panorâmica do parênquima pulmonar do grupo Ni. B) Imagem panorâmica do parênquima pulmonar do grupo Pb7dpi com espessamento de septo interalveolar (cabeças de seta), edema perivascular (seta). C) Imagem panorâmica do parênquima pulmonar do grupo Pb20dpi com espessamento de septo interalveolar (cabeças de seta). D) Imagem em maior aumento representativa do grupo Pb20pi mostrando detalhes. Coloração hematoxilina & Eosina. Barra de escala da menor ampliação = 100 μ m. Barra de escala da maior ampliação = 60 μ m.

Seguindo com a avaliação das modificações fisiopatológicas, a função pulmonar foi analisada por meio da técnica de espirometria forçada em respirador mecânico no sétimo dia pós-infecção (figura 24). Foram avaliados diferentes tipos de parâmetros fisiológicos nos pulmões de camundongos: (i) avaliação das variações de volume pulmonar em função da lesão tecidual, demonstrado pela Capacidade Inspiratória (figura 24-A), Capacidade Vital Forçada (figura 24-B), Volume expiratório forçado a 100 msec (FEV100) (figura 24-C) e o Índice de Tiffeneau (FEV50/FVC), razão usada no diagnóstico de doença pulmonar obstrutiva e restritiva humana (figura 24-D); (ii) avaliação das propriedades elásticas do tecido pulmonar, mensurada pela complacência, que consiste na diferença entre a pressão intra-alveolar e a pressão arterial (Complacência = Δ Volume/ Δ Pressão), avaliada neste trabalho como Complacência Pulmonar Dinâmica (Cdyn), que é a complacência do pulmão a qualquer momento durante o movimento real do ar (figura 24-E); (iii) Resistência Pulmonar (RI), que é a resistência do trato respiratório ao movimento do fluxo de ar durante a inspiração e expiração normais, onde $RI = [(Pressão\ Atmosférica - Pressão\ Alveolar)/V]$ (figura 24-F).

Através da utilização de Manobra Pulmonar Forçada, observamos que as lesões do parênquima pulmonar provocadas pelo *P. berghei* NK65 geraram alterações no funcionamento pulmonar. Tal fato foi constatado pela observação do aumento das forças elásticas pulmonares avaliadas pela perda de complacência dinâmica (figura 24-F), e aumento de resistência pulmonar (figura 24-E), nos animais infectados por vinte dias quando comparados ao grupo controle. No entanto, não houveram alterações na capacidade vital forçada (figura 24-A), capacidade inspiratória (figura 24-B) e no volume expiratório forçado a 100 msec dos animais infectados quando comparados ao grupo controle. Em última análise, esses resultados sugerem que o comprometimento da função pulmonar ocorre devido a lesão pulmonar provocada pela presença parasito, associada ao processo inflamatório causado por ele, na fase tardia da infecção.

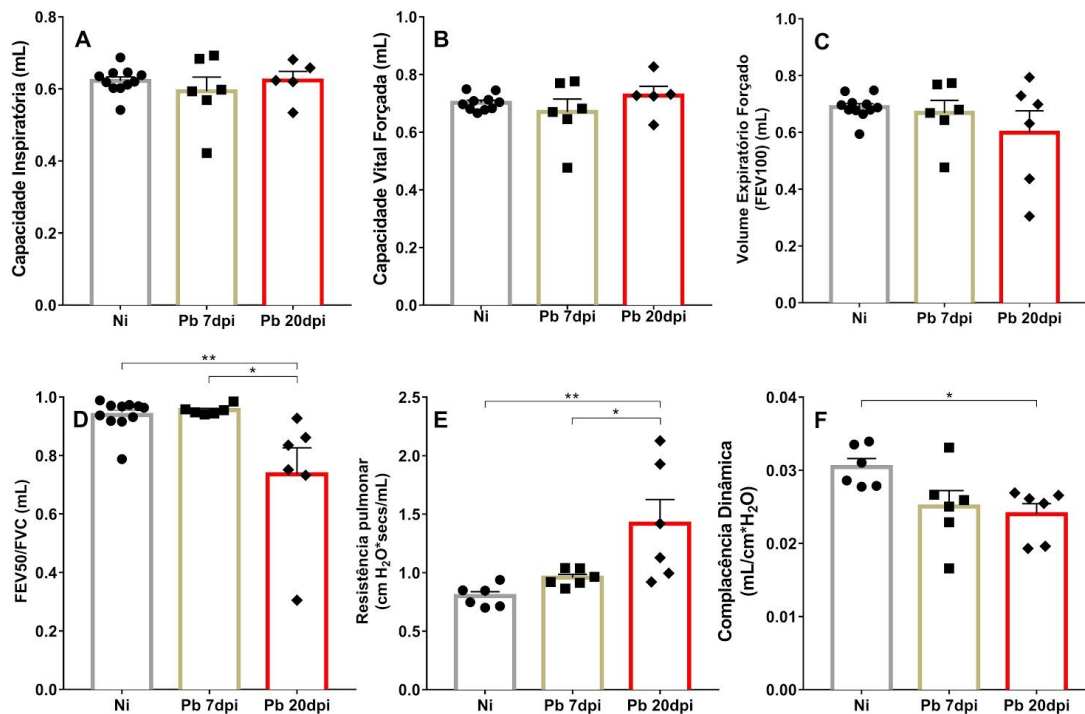


Figura 24: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. A) Capacidade inspiratória. B) Complacência Vital Forçada. C) Volume Expiratório Forçado. D) FEV50/FVC. E) Resistência pulmonar. E) Complacência Dinâmica. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média ± SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * p < 0,05 e ** p < 0,01.

Para avaliar as características da inflamação do tecido pulmonar, foi realizada a avaliação da atividade N-acetilglicosaminidase de macrófagos (NAG), mieloperoxidase de neutrófilos (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO), além da quantificação das células presentes nas vias aéreas e a análise do perfil de citocinas no tecido pulmonar. Primeiramente, foi evidenciado uma redução gradual e significativa da atividade MPO e EPO ao longo do tempo de infecção (figura 25-B e C, respectivamente), sugerindo modulação dessas células no pulmão. No entanto, não houve alterações quanto a atividade NAG de macrófagos no pulmão dos animais infectados (figura 25-A).

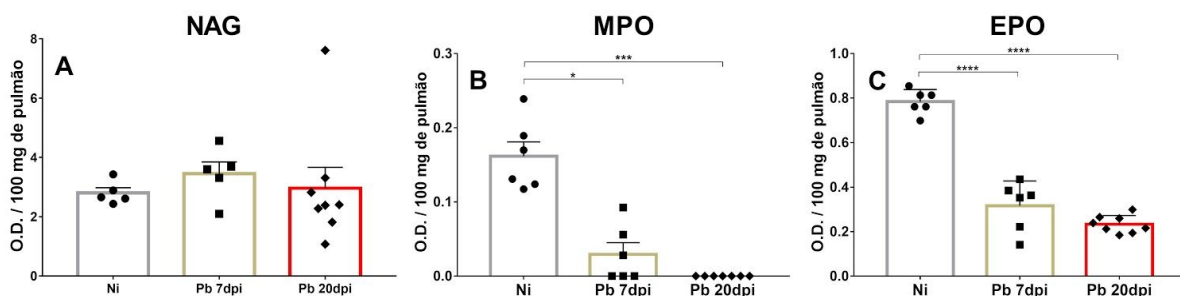


Figura 25: Níveis da atividade de NAG, MPO e EPO no tecido pulmonar de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. A) Níveis da atividade de

NAG. B) Níveis da atividade de MPO. C) Níveis da atividade de EPO. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

As análises do BAL revelaram a presença de sangramento nas vias aéreas de camundongos com sete dias de infecção, resultado consistente com os níveis de hemoglobina (figura 26-A) e de proteína total (figura 26-B) significativamente maiores no BAL destes animais quando comparados ao grupo controle. No entanto, a quantidade de proteína totais retornaram a níveis basais após vinte dias de infecção. Em relação à celularidade do BAL, houve um aumento significativo do número de leucócitos totais no BAL dos animais com vinte dias de infecção em relação aos animais do grupo controle (figura 26-C). Quanto a avaliação da contagem diferencial de células do BAL, houve um aumento significativo de macrófagos no vigésimo dia pós-infecção (figura 26-D) e de linfócitos no sétimo dia pós-infecção (figura 26-E) quando comparados ao grupo controle. Outrossim, não foi detectada a presença de granulócitos nas vias aéreas dos camundongos infectados (figura 26-F e G).

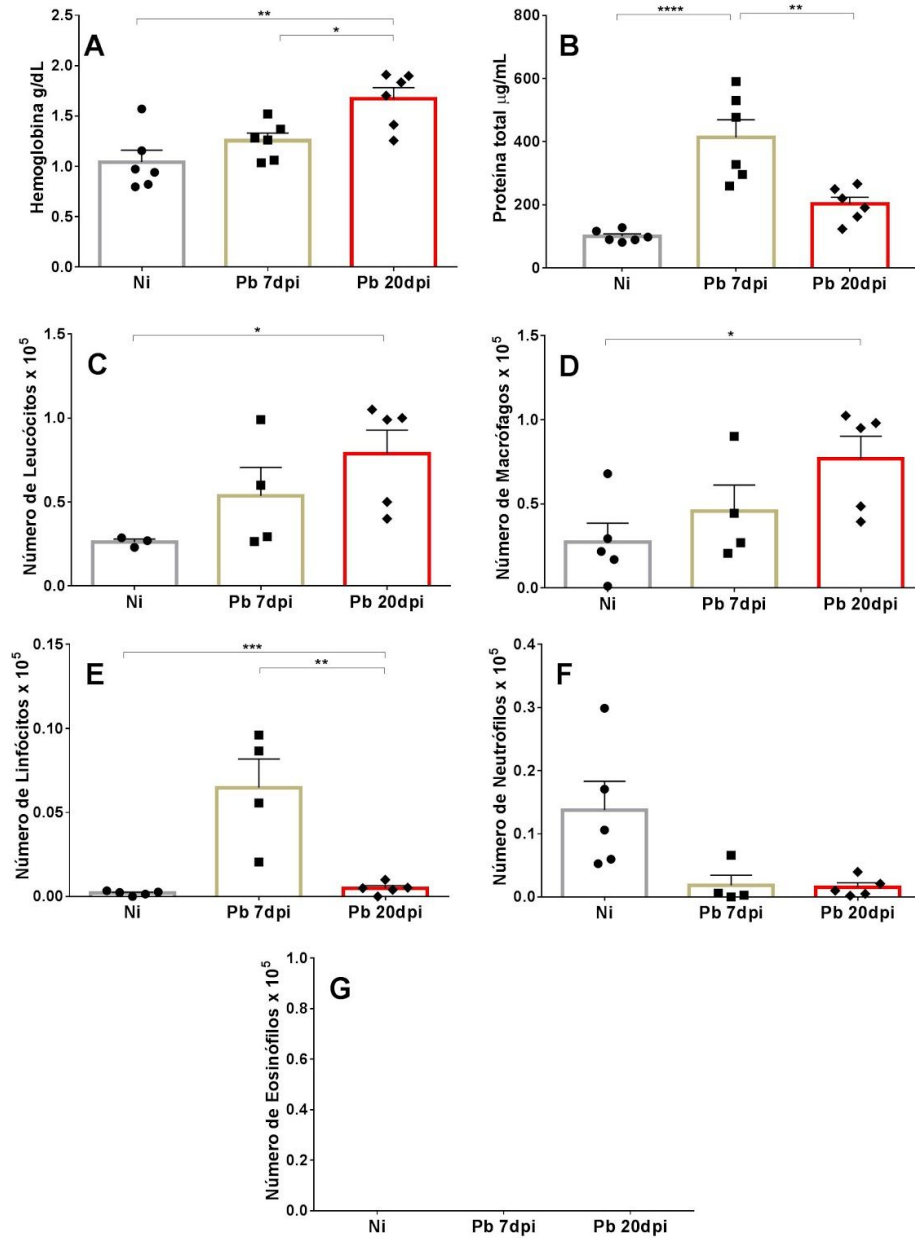


Figura 26: Níveis de hemoglobina, proteína total, contagens de células mononucleares e granulócitos no BAL de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. A) Níveis de hemoglobina no BAL. B) Níveis totais de proteína no BAL. C) Contagens totais de leucócitos no BAL. D) Contagens de macrófagos no BAL. E) Contagens de linfócitos no BAL. F) Contagens de neutrófilos no BAL. G) Contagens eosinófilos no BAL. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foi utilizado para avaliar diferenças entre os grupos. Os resultados estão apresentados como a média \pm SEM e foram representados pelo símbolo (*) nos gráficos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Quanto ao perfil de citocinas do tecido pulmonar durante a infecção (figura 27), a produção de citocinas de perfil Th1 foi regulada positivamente, com aumento significativo da produção das citocinas IFN- γ no sétimo dia pós-infecção (figura 27-B), de IL-1 β no vigésimo dia pós-infecção (figura 27-A) quando comparado ao grupo controle e ao grupo infectado por

sete dias, e de IL-12 em ambos os tempos (figura 27-C) quando comparado ao grupo controle. Uma exceção a esse padrão foi a produção da citocina IL-6, que teve a sua produção diminuída significativamente nos dois tempos de infecção (figura 27-D). Em contrapartida, a produção de citocinas de perfil Th2 foi regulada negativamente ao longo da infecção, resultante da produção significativamente menor de IL-4 no vigésimo dia pós-infecção (figura 27-E), IL-5 no sétimo dia pós-infecção (figura 27-F) e IL-13 em ambos os tempos (figura 27-G) quando comparados ao grupo controle. Quanto a citocinas de perfil regulatório, houve uma produção significativamente menor de IL-10 no sétimo dia pós-infecção (figura 27-H), enquanto que não foram encontradas diferenças significativas relacionadas a produção de TGF- β (figura 27-I). A produção da citocina IL-17 também foi significativamente menor, em ambos os tempos de infecção (figura 27-J).

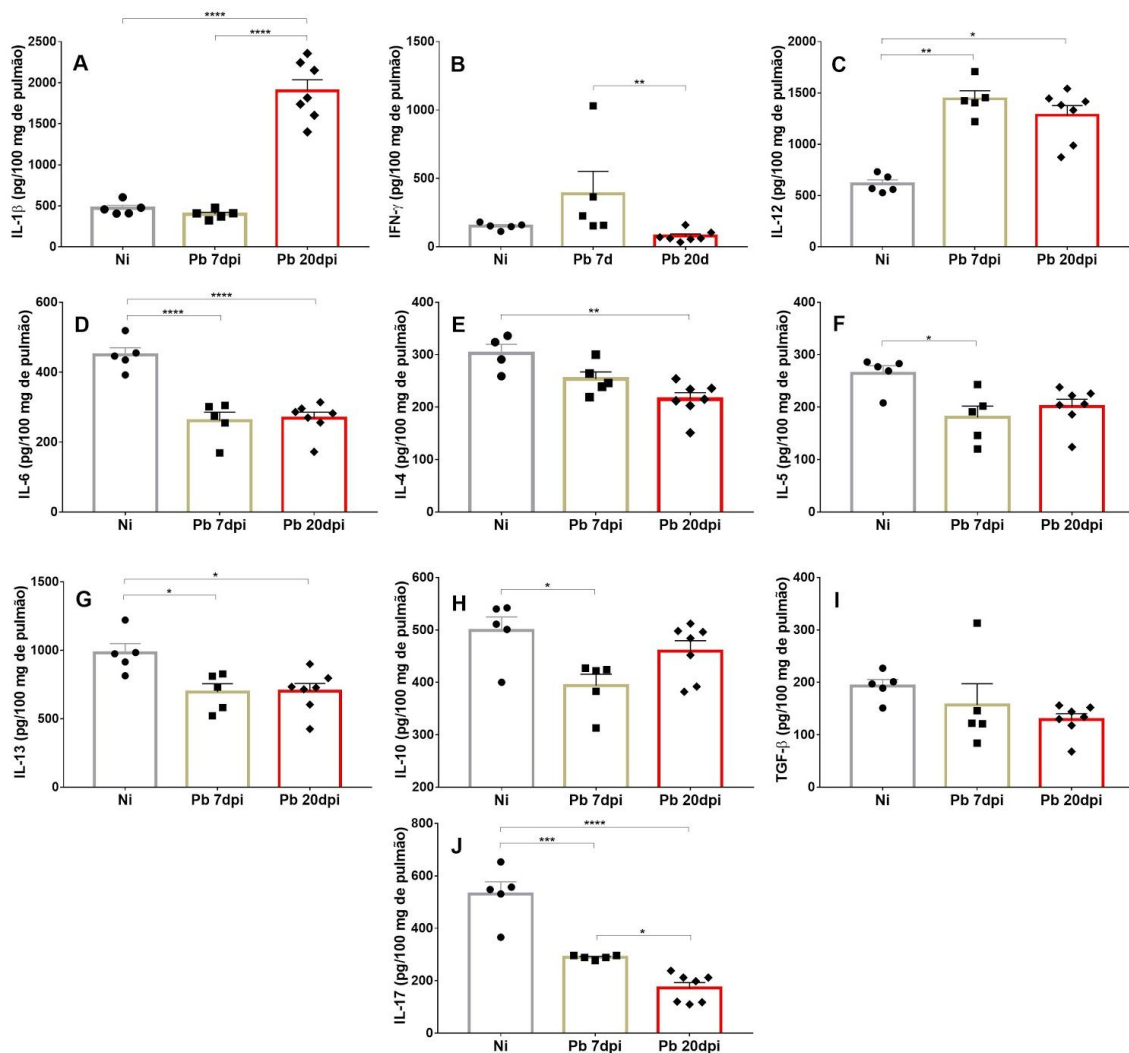


Figura 27: Citocinas dosadas no tecido pulmonar de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65 no sétimo e vigésimo dia pós-infecção. A) Níveis de IL-1 β . B) Níveis de IFN- γ . C)

Níveis de IL-12. D) Níveis de IL-17. E) Níveis de IL-4. F) Níveis de IL-5. G) Níveis de IL-6. H) Níveis de IL-13. I) Níveis de IL-10. J) Níveis de TGF- β . O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Em conjunto, os dados obtidos neste capítulo indicam que a infecção pela cepa NK65 do *P. berghei* em camundongos C57BL/6j induz lesão hepática e pulmonar que implica no comprometimento da função desses órgãos. Tal fato está associado ao aumento da produção de citocinas de perfil Th1 e à regulação negativa da produção de citocinas de perfil Th2, Th17 e T regulatórias decorrentes da constante multiplicação do parasito, resultando na morte do animal. As complicações sistêmicas que ocorrem nesse modelo caracterizam um modelo muito próximo ao que ocorre na malária por *P. vivax*, principalmente em relação à preferência de invasão dos reticulócitos e o consequente quadro de anemia grave encontrado nos animais infectados.

5.2. A COINFECCÃO EXPERIMENTAL POR *Ascaris suum* E *Plasmodium berghei* NK65

Os resultados expostos neste capítulo visam entender a influência da infecção helmíntica, na sua fase larval, sobre a infecção malárica experimental em seus aspectos clínicos, fisiopatológicos e imunobiológicos.

5.2.1. Animais coinfectedos têm baixa taxa de sobrevivência e alta carga parasitária larval

A coinfeccção por *A. suum* e *P. berghei* cepa NK65 desenvolveu-se de forma abrupta, com curso letal. A mortalidade dos animais teve início no oitavo dia pós-infecção e perdurou até o décimo primeiro dia pós-infecção, com um pico no nono dia pós-infecção (figura 27). Diferenças significativas foram encontradas na sobrevivência dos animais coinfectedos em relação aos grupos monoinfectados e ao grupo controle. De modo geral, os animais coinfectedos apresentaram letalidade precoce em relação aos demais grupos. Animais monoinfectados por *A. suum* (As) apresentaram letalidade baixa, não sendo significativa quando comparada ao grupo controle. Por outro lado, a monoinfecção por *P. berghei* (Pb) também exibia altas taxas de letalidade, no entanto, se manifestou tardiamente quando comparado ao grupo coinfectedo (PbAs).

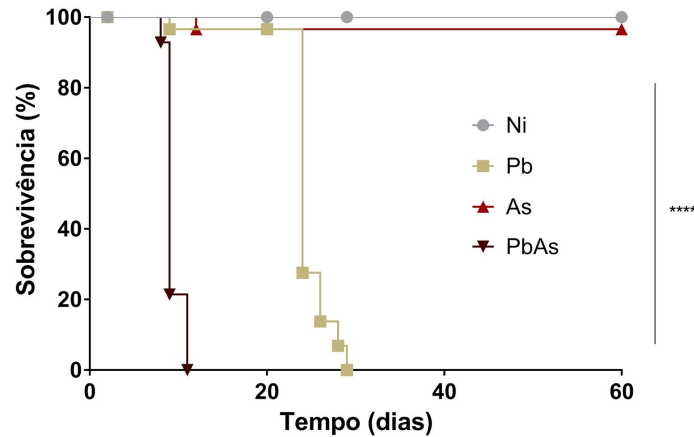


Figura 28: Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum*. Os animais foram monitorados diariamente a partir do primeiro dia pós-infecção. Para análise estatística foi utilizado o teste Gehan-Breslow e **** indica diferença significativa ($p < 0.0001$) na sobrevivência entre os grupos. (n=6 para animais não infectados (Ni) e n=15 para animais monoinfectados por *Plasmodium berghei* NK65 (Pb), animais monoinfectados por *Ascaris suum* (As) e coinfectados (PbAs)).

Ao avaliarmos a variação da massa corporal dos animais (figura 29), foi notável a perda de massa acentuada ao longo da coinfeção, que se desenvolveu mais precocemente em relação ao grupo monoinfectado por *P. berghei* NK65. Os animais coinfectados começam a perder massa por volta do sexto dia pós-infecção, persistindo até o décimo dia pós-infecção. Curiosamente, animais monoinfectados por *A. suum* também sofreram grande perda de massa corporal ocorrida de maneira similar ao grupo coinfectado, no entanto, esses animais se recuperaram por volta do décimo dia pós-infecção, o que coincide com o término da migração larval do helminto no camundongo. Animais do grupo controle apresentaram um aumento contínuo da massa corporal ao longo das observações.

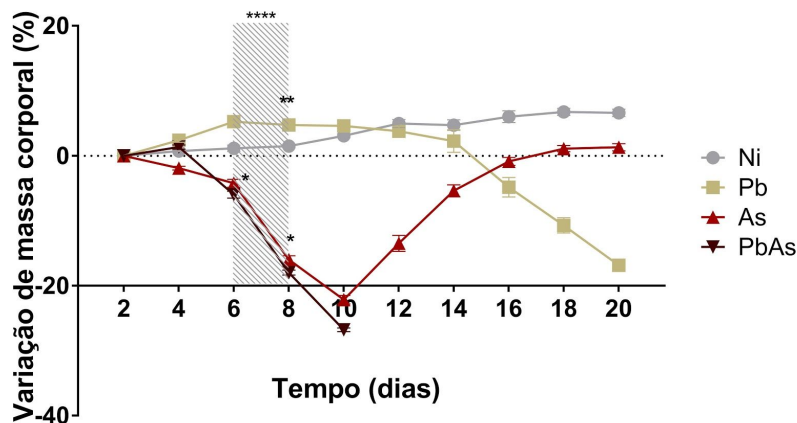


Figura 29: Variação da massa corporal (%) de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum*. A área hachurada representa os tempos que foi possível obter

análise estatística. O teste One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e os resultados significativos são representadas por (*) nos gráficos. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

Outros sinais clínicos foram observados a partir sexto dia pós-infecção, quando os animais coinfectados já apresentavam manifestações clínicas graves como: pêlos arrepiados, palidez, tremulação corpórea, motilidade reduzida, postura encurvada e dificuldade respiratória. Foi possível observar o eriçamento dos pêlos e a dificuldade respiratória dos animais monoinfectados por *A. suum* a partir do oitavo dia pós-infecção, quadro que se agravou no décimo dia pós-infecção com a presença de chiados, mas que houve recuperação espontânea da maioria dos animais no décimo quarto dia pós-infecção. Quanto ao grupo de animais monoinfectados por *P. berghei*, só foi possível perceber o agravamento da sintomatologia clínica a partir do décimo quinto dia pós-infecção ocorrendo de maneira similar ao grupo coinfectado. A observação macroscópica das vísceras dos camundongos infectados durante a necropsia evidenciou a presença de esplenomegalia nos animais monoinfectados por *P. berghei* NK65 e nos animais coinfectados. Além disso, camundongos monoinfectados por *A. suum* e coinfectados tinham pulmões apresentando áreas avermelhadas, sugerindo lesões ocasionadas pela migração de larvas no órgão.

Ainda na caracterização clínica da infecção, ao avaliar o perfil hematológico, foi possível detectar um aumento significativo do número de total de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos circulantes dos coinfectados quando comparado com os outros grupos (tabela 3). Já as contagens de eosinófilos foram significativamente aumentadas nos animais monoinfectados por *A. suum* em relação ao grupo controle e ao grupo monoinfectado por *P. berghei* NK65. A análise dos compartimentos de glóbulos vermelhos demonstrou uma redução significativa da contagem de eritrócitos totais e dos níveis de hemoglobina do grupo coinfectado em relação ao grupo monoinfectado por *A. suum* e ao grupo controle, e em contrapartida, houve o aumento significativo desses mesmos parâmetros dos animais infectados por *A. suum* em relação ao grupo controle e ao grupo monoinfectado por *P. berghei* NK65. Em relação a contagem de plaquetas, houve diminuição significativa nos animais coinfectados quando comparados aos animais monoinfectados e no grupo monoinfectado por *P. berghei* NK65 em relação ao grupo controle. Por outro lado, houve o aumento significativo do número de plaquetas no grupo monoinfectado por *A. suum* quando comparado ao grupo monoinfectado por *P. berghei* NK65 e ao grupo controle.

Tabela 3. Análise de hemograma de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum*

	Grupos			
	Ni	Pb	As	PbAs
Leucócitos Totais (x 10³/μL)	4,67 ± 1,43	10,92 ± 9,26	4,18 ± 1,45	18,75 ± 2,80 ^{a,b,c}
Linfócito (x 10 ³ /μL)	4,09 ± 1,27 (85-91%)	9,06 ± 7,53 (80-88%)	2,66 ± 1,14 ^b (52-77%)	14,39 ± 1,87 ^{a,b,c} (71-83%)
Monócito (x 10 ³ /μL)	0,20 ± 0,16 (2-6%)	1,06 ± 1,0 (1-11%)	0,26 ± 0,18 (2-10%)	1,11 ± 0,48 ^{a,b,c} (4-8%)
Neutrófilo (x 10 ³ /μL)	0,36 ± 0,17 (5-11%)	0,79 ± 0,17 (6-14%)	1,21 ± 0,50 (20-40%)	3,22 ± 1,42 ^{a,b,c} (11-23%)
Eosinófilo (x 10 ³ /μL)	0,01 ± 0,01 (0-1%)	0,00 ± 0,00 (0-1%)	0,06 ± 0,05 ^{a,b} (1-3%)	0,03 ± 0,01 ^c (0-1%)
Eritrócito (x 10⁶/μL)	8,47 ± 0,60	7,47 ± 0,92	8,81 ± 2,74 ^{a,b}	7,06 ± 0,65 ^{a,c}
Hemoglobina (g/dL)	16,18 ± 1,10	14,17 ± 1,72	16,87 ± 5,05 ^{a,b}	13,90 ± 1,15 ^{a,c}
Plaqueta (x 10³/μL)	320 ± 133	111 ± 37 ^a	538 ± 90 ^{a,b}	274 ± 114 ^{b,c}

O teste One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média ± DP e os resultados significativos ($p \leq 0,05$) relacionadas aos grupos Ni, Pb e As são representadas por (a), (b) e (c) respectivamente. (n=6 para animais não infectados (Ni), monoinfectados por *Plasmodium berghei* NK65 (Pb), monoinfectados por *Ascaris suum* e n=8 para animais coinfectados).

Visando entender se a coinfeção influenciaria na carga parasitária de *Ascaris*, foram realizados experimentos para recuperação de larvas dos pulmões e do fígado realizados no sétimo dia pós-infecção. Através da contagem do número de larvas recuperadas, foi verificado que, embora não haja diferença significativas na quantidade total de larvas recuperadas do fígado (figura 29-A) e dos pulmões nos animais mono infectados por *A. suum* e coinfectados (figura 29-B), o grupo coinfectado apresentou uma diminuição significativa do número de larvas recuperadas do parênquima pulmonar e um aumento significativo no número de larvas recuperadas das vias aéreas quando comparado ao grupo monoinfectado por *A. suum* no sétimo dia pós-infecção (figura 29-C e 9D). Tal resultado sugere que a passagem de larvas no pulmão seria mais precoce nos animais coinfectados, acarretando em alteração da cinética de migração de larvas.

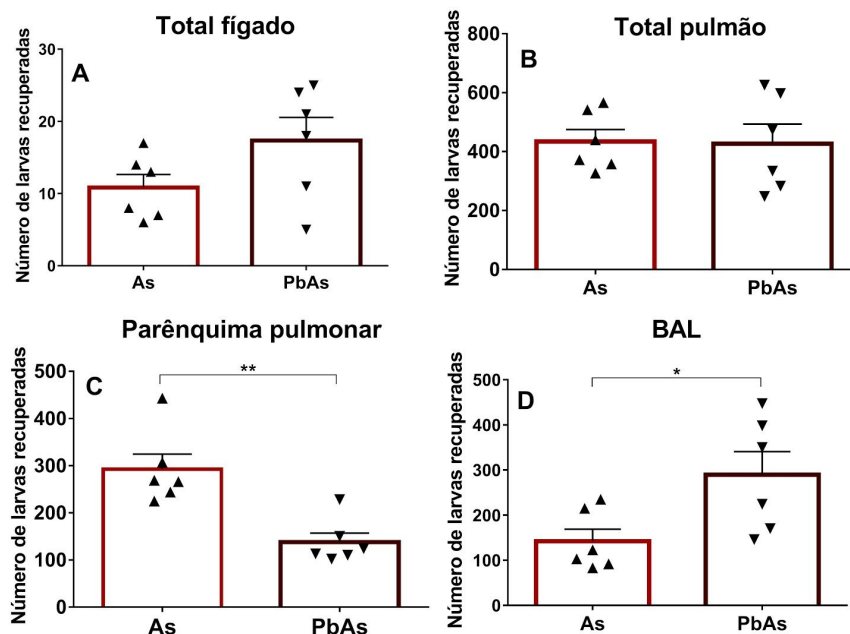


Figura 30: Número de larvas recuperadas dos pulmões dos camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Número total de larvas no parênquima hepático. B) Número de total de larvas no parênquima pulmonar. C) Número de larvas no parênquima pulmonar. D) Número de larvas nas vias aéreas. O teste t-student foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e os resultados significativos são representadas por (*) nos gráficos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A evolução da parasitemia de *P. berghei* dos animais infectados pelo parasito foi acompanhada através da análise dos esfregaços sanguíneos, em dias alternados, a partir do segundo dia pós-infecção. A observação microscópica dos esfregaços sanguíneos revelou que a coinfeção não altera a progressão da parasitemia do parasito quando comparados ao grupo monoinfectado por *P. berghei* NK65 (figura 31).

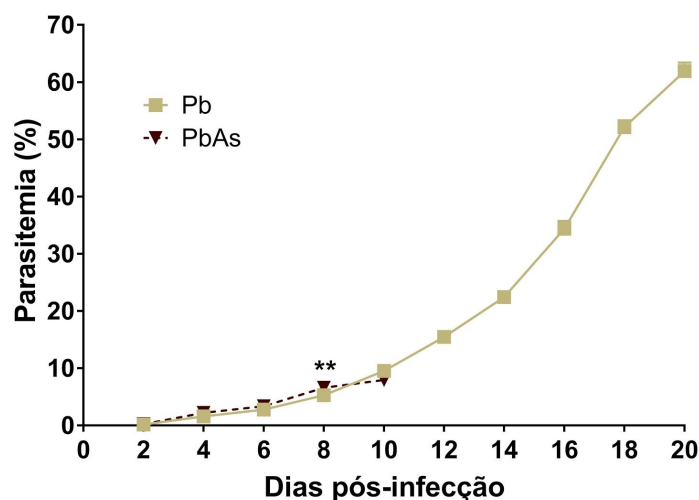


Figura 31: Curva de parasitemia dos camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum*. O teste One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados

como a média \pm SEM e os resultados significativos são representadas por (*) nos gráficos. ** $p < 0,01$.

5.2.2. A coinfeção experimental por *Ascaris suum* e *Plasmodium berghei* NK65 induz hipertrofia e hiperplasia esplênica

A partir da análise histopatológica do baço dos camundongos coinfectados, foi possível a identificação com a presença de hipertrofia e hiperplasia de todos os nódulos linfáticos, proliferação das regiões B e T dependente (figura 31-E). Nos nódulos linfáticos, foi evidenciado a presença de macrófagos frequentemente apresentando citoplasma contendo pigmento malárico, cuja deposição também era evidente no interstício da polpa vermelha. Também foi possível observar o aumento do número de megacariócitos presentes na polpa vermelha. Tais alterações foram similares às encontradas no grupo mono infectado por *P. berghei* (figura 31- B e C). Quanto aos camundongos pertencentes ao grupo As, foi evidenciado apenas hiperplasia e hipertrofia de alguns nódulos linfáticos com proliferação de regiões B dependentes (figura 31-D). Nesse grupo também foi observado o aumento discreto de megacariócitos na polpa vermelha.

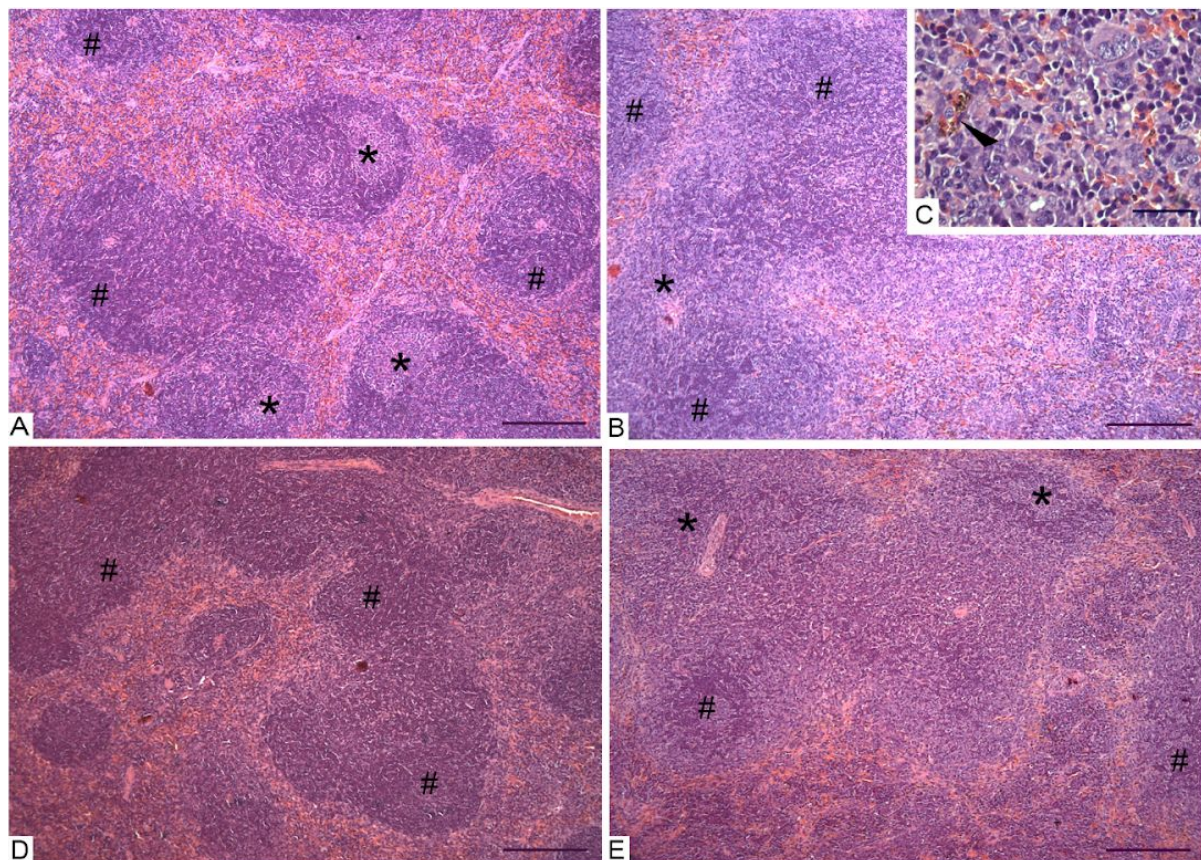


Figura 32: Fotomicrografia do baço de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Imagem panorâmica do parênquima esplênico do grupo Ni evidenciando região T dependente (*) e B dependente (#). B) Imagem

panorâmica do parênquima esplênico do grupo Pb com proliferação da região T dependente (*) e B dependente (#). C) Imagem em maior aumento representativa do grupo Pb com presença de macrófago exibindo pigmento malárico em seu citoplasma (setas). D) Imagem panorâmica do parênquima esplênico do grupo As com proliferação da B dependente (#); E) Imagem panorâmica do parênquima esplênico do grupo PbAs com proliferação da região T dependente (*) e B dependente (#). Coloração hematoxilina & Eosina. Barra de escala da menor ampliação = 100 µm. Barra de escala da maior ampliação = 60 µm.

5.2.3. A coinfeção experimental por *Ascaris suum* e *Plasmodium berghei* NK65 provoca intensa lesão no fígado e consequente comprometimento da função hepática

Na análise histopatológica semiquantitativa do fígado, foi observado o aumento significativo de áreas lesionadas e de inflamação nos animais mono e coinfectados quando comparados ao grupo controle. No entanto, o *score* de de lesão e inflamação hepática foi significativamente maior nos animais coinfectados quando comparado aos grupos de animais monoinfectados e ao grupo controle (figura 33).

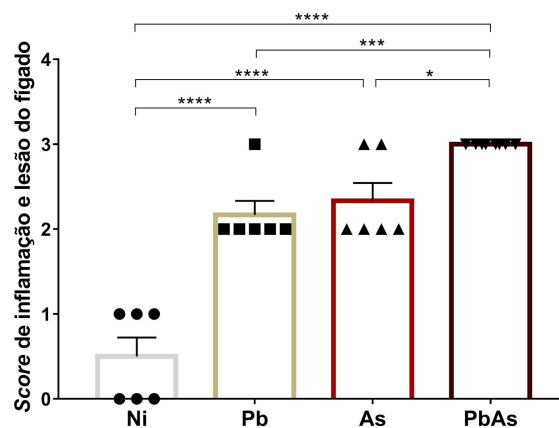


Figura 33: Avaliação semiquantitativa da inflamação e lesão hepática dada por *score* de inflamação e lesão de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. O teste One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM e os resultados significativos são representadas por (*) nos gráficos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Esse resultado foi confirmado na análise microscópica do parênquima hepático dos animais coinfectados, em que foi possível identificarmos a presença de um intenso infiltrado inflamatório de composição mista, difuso e multifocal pelo parênquima do órgão, caracterizado predominantemente por linfócitos e, menos frequente, por polimorfonucleares. Também foram observadas zonas exuberantes de necrose e zonas hemorrágicas dispersas pelo parênquima. Em todos os animais do grupo, foi possível observar a presença de larvas e formação de granulomas (figuras 34-F e G). Esse perfil foi diferente do encontrado nos

animais mono infectados por *A. suum*, em que foi observado a presença infiltrado inflamatório composto majoritariamente por eosinófilos e em menor proporção por linfócitos e macrófagos (figura 34-D e E). No entanto, em alguns animais desse grupo, também foram evidenciados a formação de granulomas pela presença de larvas, e zonas de necrose dispersas pelo parênquima, ainda que menos frequentes e com menores extensões se comparado às encontradas nos animais do grupo coinfecção. Ademais, nos animais mono infectados por *P. berghei* NK65 foi observada a presença discreta a moderada de um infiltrado inflamatório linfocitário difuso no início da infecção (figura 34-B e C).

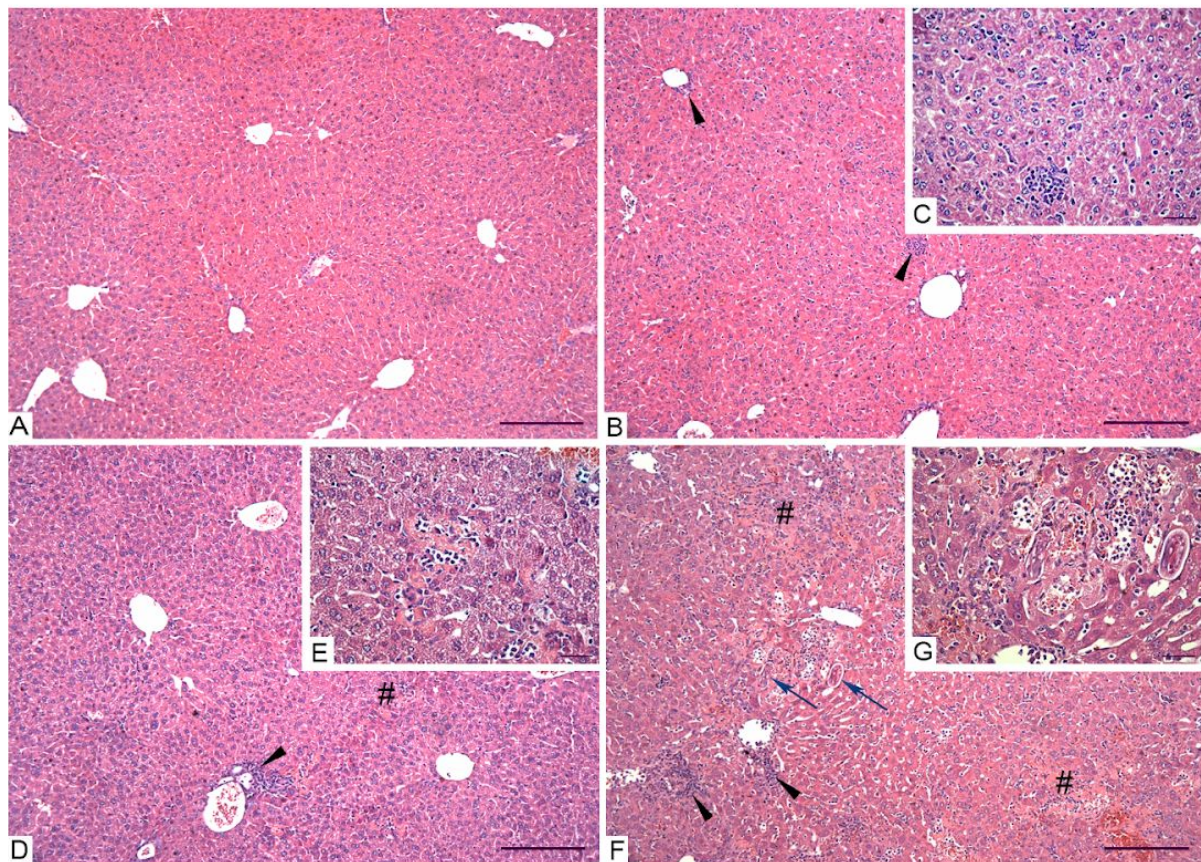


Figura 34: Fotomicrografia do fígado de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Imagem panorâmica do parênquima hepático do grupo Ni. B) Imagem panorâmica do parênquima hepático do grupo Pb com presença de infiltrado inflamatório (cabeças de seta). C) Insert da imagem anterior mostrando detalhes. D): Imagem panorâmica do parênquima hepático do grupo As com presença de infiltrado inflamatório (cabeças de seta), zonas de necrose (#). E) Insert da imagem anterior mostrando detalhes. F) Imagem panorâmica do parênquima hepático do grupo PbAs com presença de infiltrado inflamatório (cabeças de seta), grandes zonas de necrose (#) e larvas de *Ascaris suum* (seta azul). G) Insert da imagem anterior mostrando detalhes. Coloração hematoxilina & Eosina. Barra de escala da menor ampliação = 100 μ m. Barra de escala da maior ampliação = 20 μ m.

Em conjunto, os achados histopatológicos corroboram as análises semiquantitativas, referentes às características das lesões avaliadas nos cortes corados em HE. Tais lesões do

parênquima hepático, provocadas por ambos os parasitos, provocaram alterações no funcionamento hepático, que foram avaliadas da dosagem da concentração plasmática das enzimas AST e ALT. Foi observado um aumento significativo dos níveis de AST nos animais coinfectados e do grupo monoinfectado por *A. suum* em relação ao grupo controle (figura 34-A). Porém, os níveis da enzima ALT foram significativamente maiores no grupo As em relação ao grupo monoinfectado por *P. berghei* NK65 e ao grupo controle. Também foi possível observar o aumento dos níveis de ALT no grupo coinfectado, apesar de não ter atingido valores significativos (figura 34-B).

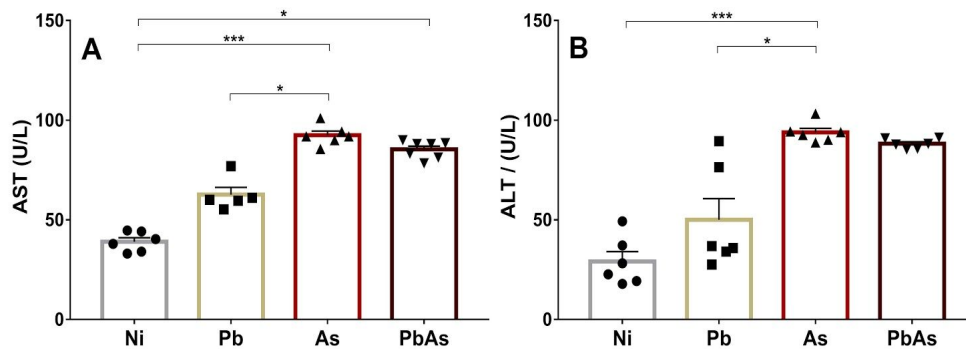


Figura 35: Enzimas hepáticas dosadas em camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Níveis de AST. B) Níveis de ALT. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

No que se refere às características do infiltrado inflamatório, as dosagens da atividade de NAG, MPO e EPO possibilitaram constatar que, camundongos coinfectados e monoinfectados por *A. suum* apresentaram aumento da atividade de macrófagos em relação ao grupo controle (figura 36-A). No entanto, animais coinfectados não apresentaram aumento da atividade de MPO e EPO, apesar de ter sido verificado a presença do infiltrado inflamatório misto no parênquima hepático desses animais (figura 36-B e C, respectivamente). Por outro lado nos camundongos monoinfectados por *A. suum* apresentaram atividade eosinofílica significativamente maior quando comparada ao grupo monoinfectado por *P. berghei* NK65 e ao grupo controle (figura 36-B). Não verificamos diferenças significativas na dosagem de MPO (figura 36-B).

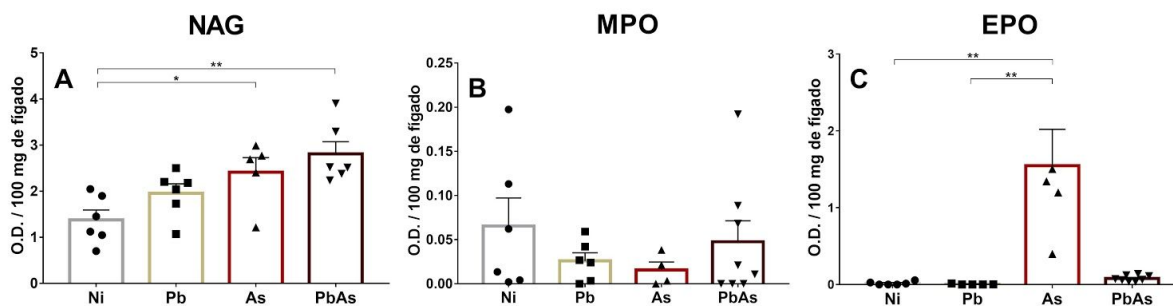


Figura 36: Níveis da atividade de NAG, MPO e EPO e no tecido hepático de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Níveis da atividade de NAG. B) Níveis da atividade de MPO. C) Níveis da atividade de EPO. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.2.4. A coinfeção experimental por *Ascaris suum* e *Plasmodium berghei* NK65 induz lesão pulmonar e comprometimento da função do pulmão e isso está associado à regulação negativa das respostas Th1, Th17, Th2 e Treg

Ao realizarmos a análise quantitativa do pulmão, constatamos que o espessamento dos septos interalveolares dos animais mono infectados por *A. suum* é significativamente maior quando comparados aos demais grupos (figura 37).

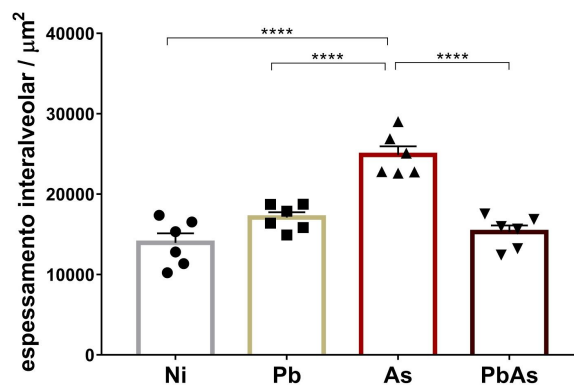


Figura 37: Área de espessamento interalveolar do pulmão de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. **** $p < 0,0001$.

Tal fato foi confirmado pela análise semiquantitativa, que, possibilitou a observação de um aumento significativo no grau de inflamação e hemorragia pulmonar no grupo mono infectado por *A. suum* (figura 38- A, B, C e E). A inflamação observada nos animais coinfectados não atingiu valores expressivos, no entanto, esses animais apresentaram *score*

de hemorragia significativamente maior em relação ao grupo monoinfestado por *P. berghei* NK65 e ao grupo controle (figura 38-D).

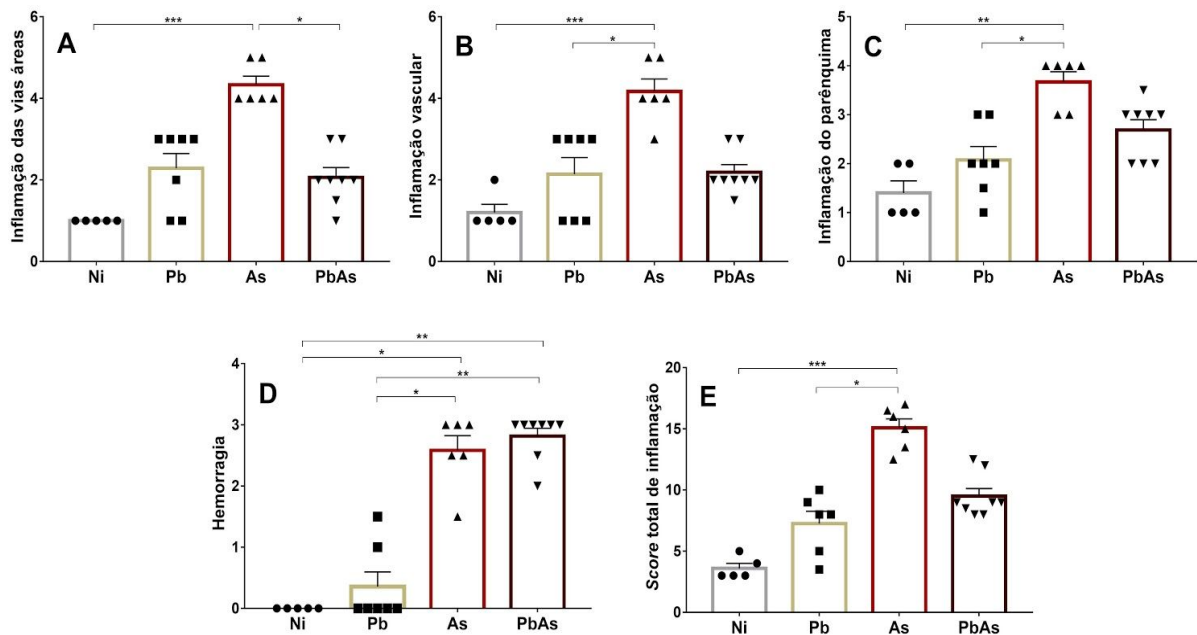


Figura 38: Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por *score* de inflamação de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Inflamação das vias aéreas. B) Inflamação vascular. C) Inflamação do parênquima. D) Hemorragia. E) *Score* total de inflamação. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Na análise microscópica do pulmão dos camundongos coinfestados, foi possível identificar a presença de infiltrado inflamatório misto difuso pelo parênquima pulmonar, caracterizado predominantemente por linfócitos e macrófagos e em menor quantidade por neutrófilos. Fenômenos exsudativos como edema perivascular, vasos congestionados e exuberantes áreas hemorrágicas, maiores do que as observadas no grupo monoinfestado por *A. suum*, também foram constatados. Além disso, todos os animais desse grupo apresentavam muitas larvas no parênquima pulmonar (figura 39-F e G). Não foi evidenciado a formação de BALT. Os camundongos pertencentes ao grupo monoinfestado por *A. suum* exibiram espessamento dos septos interalveolares às custas do infiltrado inflamatório misto caracterizado por eosinófilos e neutrófilos e, em algumas regiões do parênquima pulmonar, pequenos infiltrados constituídos por linfócitos e macrófagos. Também foram evidenciados fenômenos exsudativos como edema perivascular, áreas hemorrágicas (figura 39-D e E). Frequentemente foi observado hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio dos brônquios e bronquíolos.

Foi constatada com frequência em todos os animais desse grupo, presença de larvas dispersas no parênquima pulmonar próximas das zonas hemorrágicas e em consequência, a formação de BALT. Quanto ao grupo Pb, as áreas de lesão foram caracterizadas pela presença de um moderado infiltrado inflamatório linfocitário difuso pelo parênquima, com alguns vasos apresentando edema perivascular (figura 39-B e C). Também foi observado a presença marcante de fenômenos exsudativos como pequenas zonas hemorrágicas e hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio dos brônquios e bronquíolos.

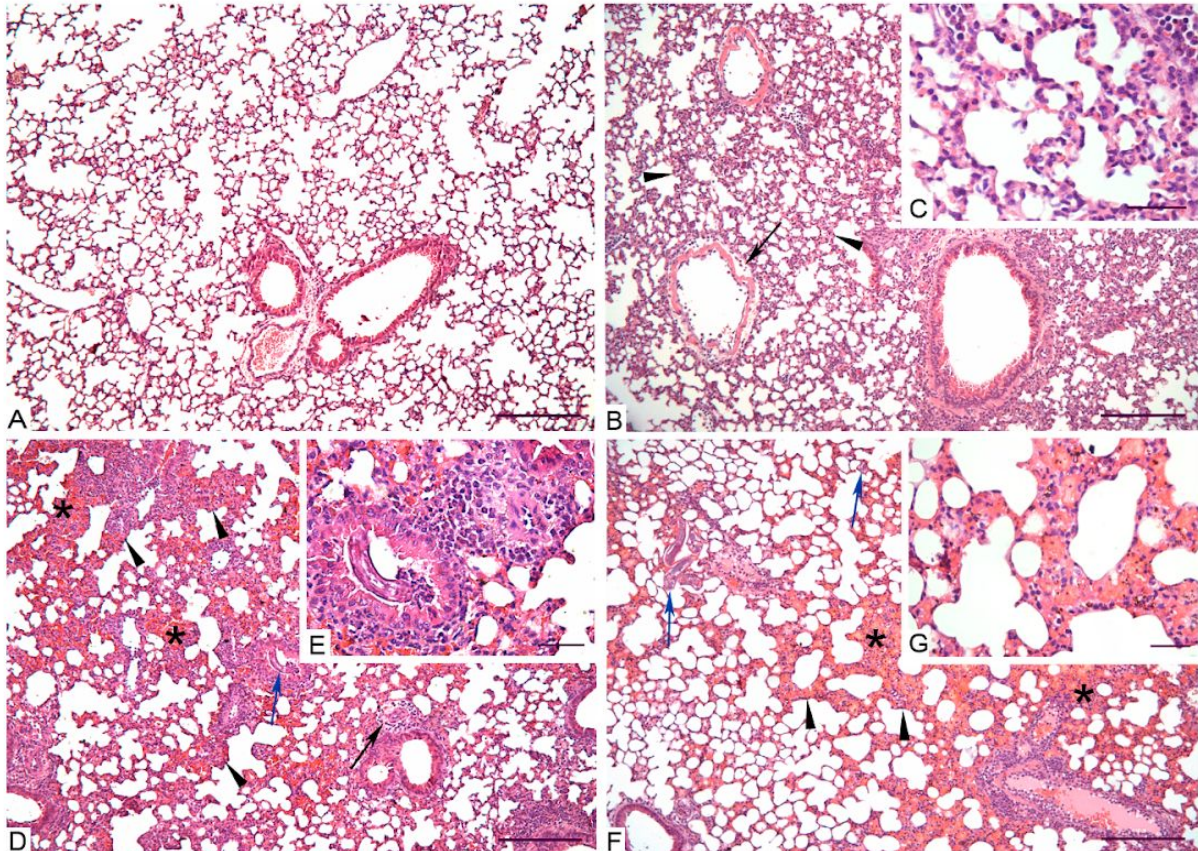


Figura 39: Fotomicrografia do pulmão de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Imagem panorâmica do parênquima pulmonar do grupo Ni. B) Imagem panorâmica do parênquima pulmonar do grupo Pb com leve espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta) e edema perivascular (seta). C) Insert da imagem anterior mostrando detalhes. D) Imagem panorâmica do parênquima pulmonar do grupo As com intenso espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (seta), larvas de *Ascaris suum* (seta azul) e hemorragia (*). E) Insert da imagem anterior mostrando detalhes. F) Imagem panorâmica do parênquima pulmonar do grupo PbAs com intenso espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), exuberante hemorragia (*). G) Insert da imagem anterior mostrando detalhes. Coloração hematoxilina & Eosina. Barra de escala da menor ampliação = 100 µm. Barra de escala da maior ampliação = 20 µm.

Além das análises histopatológicas, a função pulmonar foi analisada por meio da espirometria forçada em respirador mecânico, que forneceu informações sobre o

funcionamento pulmonar nos diferentes modelos. Foi verificado que a coinfeção causou perda de área respiratória, induzida conforme indicado pela redução significativa da capacidade inspiratória (figura 40-A) e a redução da capacidade vital forçada nos animais coinfectados (figura 40-B) quando comparados aos camundongos mono infectados por *P. berghei* NK65 e ao grupo controle. No diz respeito à avaliação da elasticidade pulmonar, observou-se que os animais coinfectados apresentaram menor complacência dinâmica (figura 40-F) e maior resistência pulmonar (figura 40-E) quando comparados aos demais grupos experimentais. Além disso, os camundongos coinfectados apresentaram alterações no fluxo respiratório no sétimo dia pós-infecção com decréscimo do volume expiratório forçado (FEV100) quando comparados aos camundongos mono infectados por *P. berghei* NK65 e ao grupo controle (figura 40-C). Juntos, nossos dados mostram que os animais coinfectados apresentaram alteração no fluxo de ar nas vias aéreas (Figura 40-F), perda da área respiratória (figura 40-A e B), redução da elasticidade do tecido (figura 40-E e F) e, conseqüentemente, a diminuição do volume pulmonar (figura 40-D), induzido majoritariamente pela migração das larvas de *A. suum* nas vias aéreas e pela inflamação local e sistêmica causada pelo plasmódio e subsequente lesão tecidual.

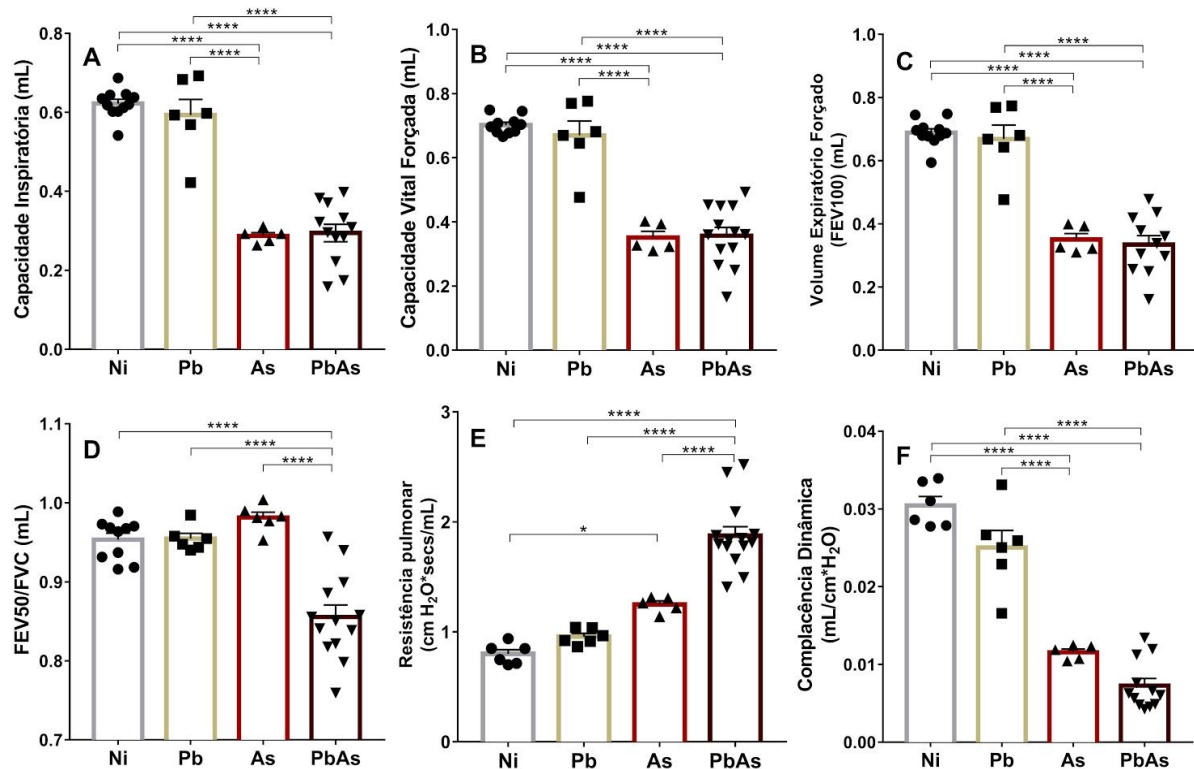


Figura 40: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Capacidade inspiratória. B) Capacidade Vital Forçada. C) Volume Expiratório Forçado. D) FEV50/FVC. E) Resistência pulmonar. F) Complacência Dinâmica.

pulmonar. E) Complacência Dinâmica. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.

Ao avaliar as características do infiltrado inflamatório pela dosagem da atividade de NAG, MPO e EPO, foi verificado uma redução significativa da atividade NAG dos camundongos coinfectados quando comparados ao grupo monoinfectado por *P. berghei* NK65 e ao grupo controle (figura 41-A). Ademais, houve um expressivo aumento da atividade de MPO e EPO em camundongos monoinfectados por *A. suum* em relação aos demais grupos (figura 41- B e C, respectivamente). Não foram detectados níveis expressivos de EPO nos camundongos dos grupos monoinfectados por *P. berghei* NK65 e coinfectados. A atividade de MPO foi significativamente menor nos camundongos dos grupos monoinfectados por *P. berghei* NK65 e coinfectados quando comparados ao grupo controle.

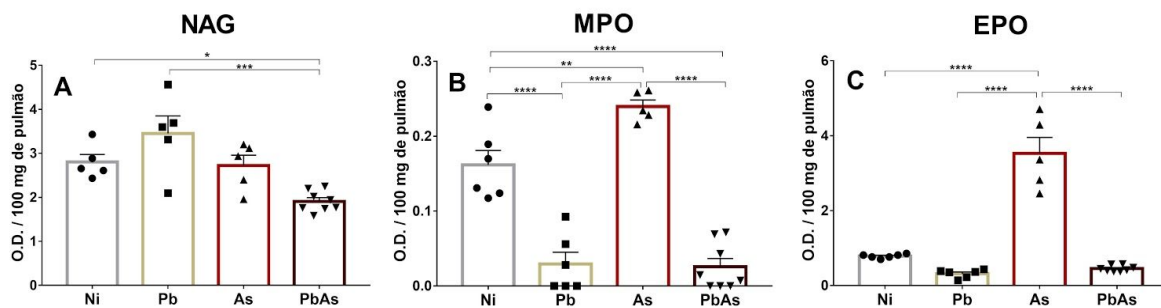


Figura 41: Níveis da atividade de NAG, MPO e EPO e no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Níveis da atividade de NAG. B) Níveis da atividade de MPO. C) Níveis da atividade de EPO. O teste One-Way Anova seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

A quantificação das células presentes nas vias aéreas por meio da contagem da celularidade no BAL, demonstrou que camundongos coinfectados apresentaram baixo recrutamento celular nas vias aéreas. Tal fato foi constatado pelo aumento significativo no número total de leucócitos dos animais monoinfectados por *A. suum* quando comparados aos demais grupos (figura 42- A). Ao avaliar os subtipos celulares, foi verificado número de linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos também foi expressivamente aumentado nos camundongos monoinfectados por *A. suum* (figura 42-B a E). Em contrapartida, foi verificado o aumento dos níveis de proteína total (figura 42-F) e hemoglobina (figura 42-G)

nos pulmões dos grupos coinfectados e mono infectados por *A. suum*, sendo mais acentuado no grupo coinfectado.

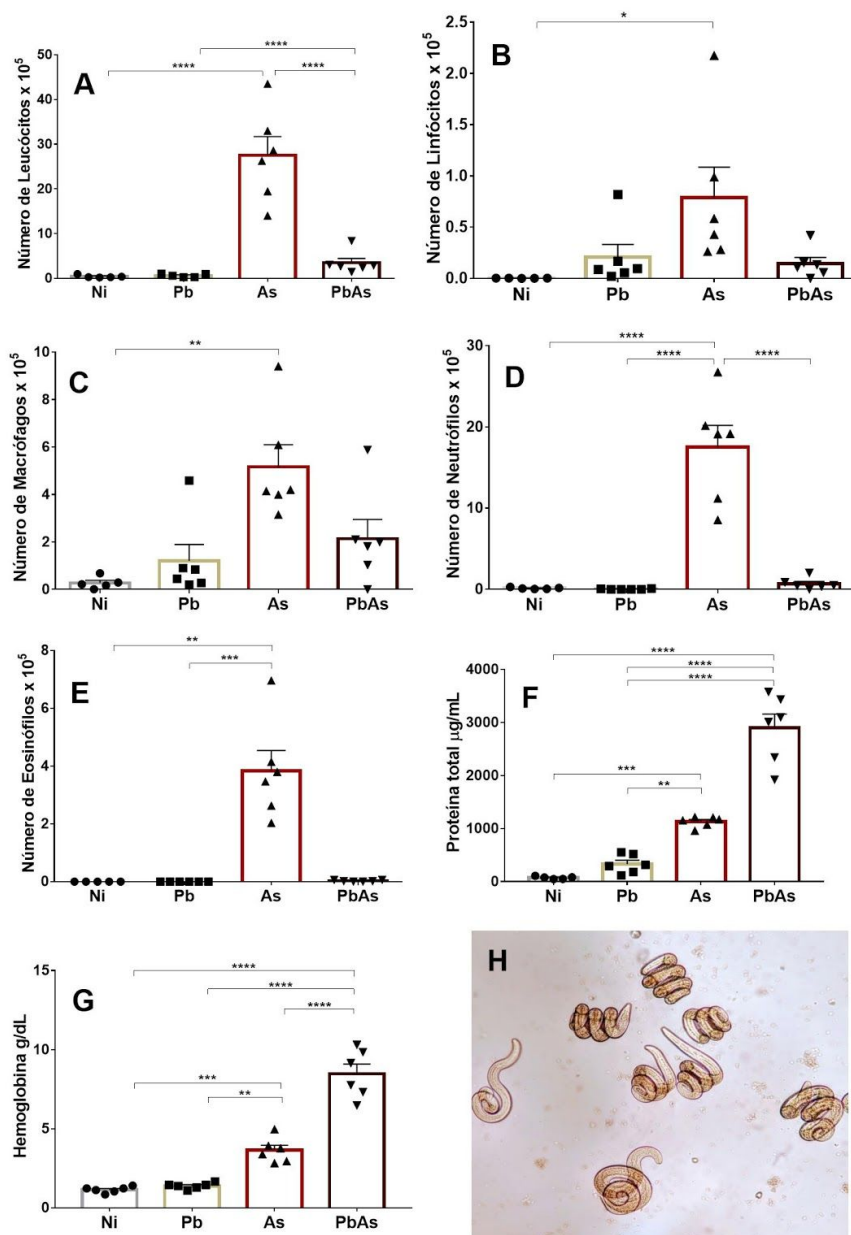


Figura 42: Níveis de hemoglobina, proteína total, contagens de células mononucleares e granulócitos no BAL de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Níveis de hemoglobina no BAL. B) Níveis totais de proteína no BAL. C) Contagens totais de leucócitos no BAL. D) Contagens de macrófagos no BAL. E) Contagens de linfócitos no BAL. F) Contagens de neutrófilos no BAL. G) Contagens eosinófilos no BAL. H) Larvas de *Ascaris suum* no BAL. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foi utilizado para avaliar diferenças entre os grupos. Os resultados estão apresentados como a média ± SEM e foram representados pelo símbolo (*) nos gráficos. * p < 0,05; ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Para avaliar o perfil de inflamação do tecido pulmonar, citocinas do tipo Th1/Th17/Th2/Treg foram dosadas no tecido pulmonar no sétimo dia pós-infecção (figura

43). Nesta análise foi possível verificar a regulação negativa das citocinas de perfil Th2, resultante da produção significativamente menor das citocinas IL-4 e IL-13 nos animais coinfectados (figura 43- A e B, respectivamente). A produção de IL-5 também foi reduzida nesse grupo, no entanto, não atingiu valores expressivos (figura 43-C). Curiosamente, as citocinas de perfil Th1 também foram reguladas negativamente na coinfecção, visto pela produção significativamente reduzida da citocina IL-1 β (figura 43-D) em relação ao grupo monoinfectado por *A. suum*, e das citocinas IFN- γ e IL-12 (figura 43-E e F, respectivamente), ainda que não expressaram valores significativos. Uma exceção é a produção da citocina IL-6, que foi significativamente aumentada nos animais coinfectados em relação ao grupo monoinfectado por *P. berghei* NK65 (figura 43-G). Quanto às citocinas de perfil regulatório, houve uma produção significativamente menor das citocinas IL-10 e TGF- β nos animais coinfectados (figura 43-H e I, respectivamente). Nos animais monoinfectados por *A. suum*, a produção das citocinas de perfil Th2 e de regulação foi significativamente maior. Também foram detectados altos níveis significativos de IL-1 β e IL-6 nos animais monoinfectados por *A. suum*, no entanto, a produção das demais citocinas de perfil Th1 foi significativamente menor. Por fim, como esperado, a produção das citocinas IFN- γ e IL-12 foi significativamente aumentada em camundongos monoinfectados por *P. berghei* NK65. No entanto, a produção da citocina IL-6 foi significativamente menor nesses animais quando comparado ao grupo controle. Não foram detectadas alterações significativas de IL-1 β para esse grupo. A produção Os níveis de IL-10 foram significativamente menores na monoinfecção pelo plasmódio. Quanto ao perfil Th17 de resposta estava regulado negativamente em todos os grupos (figura 43-J).

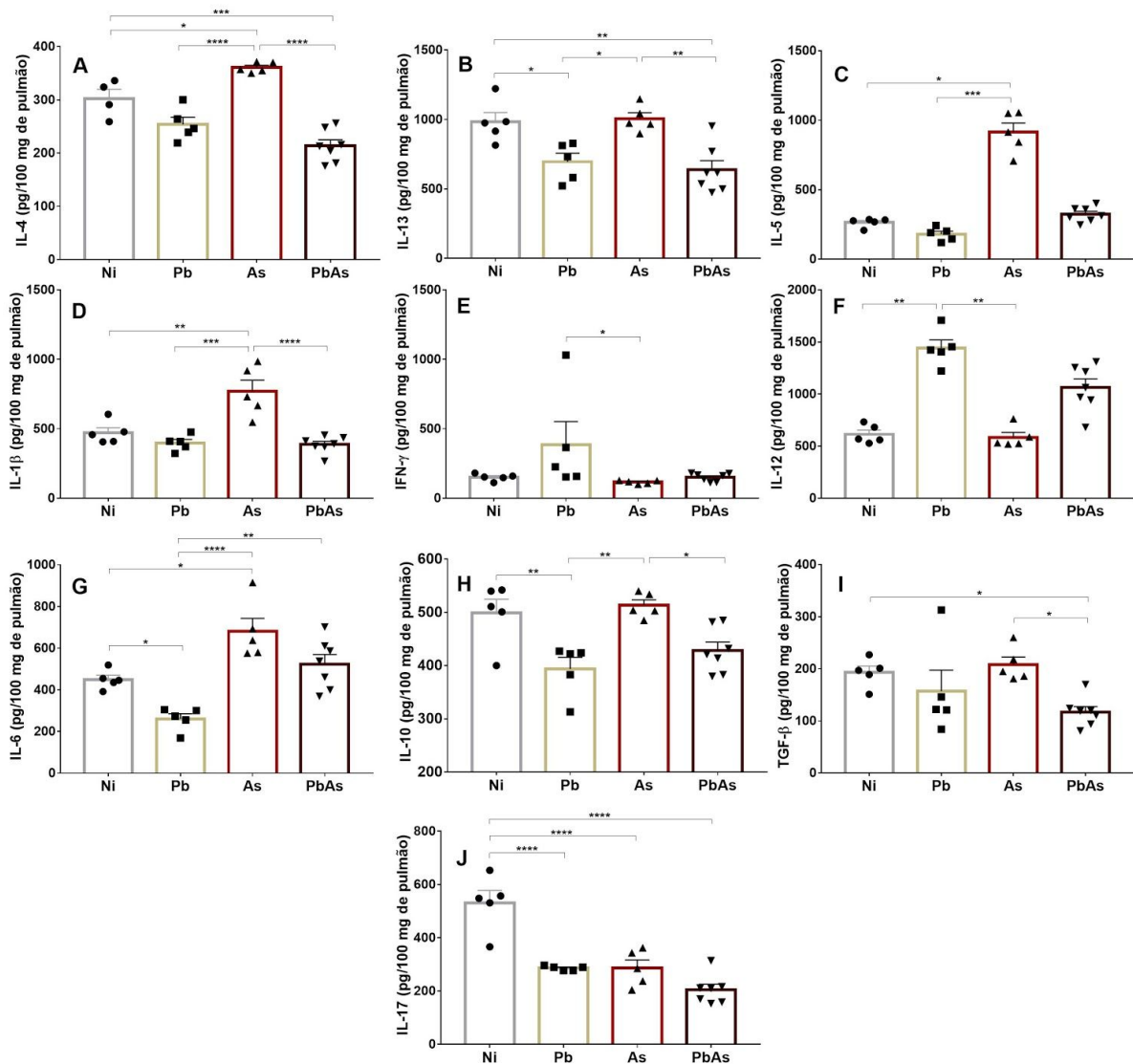


Figura 43: Citocinas dosadas no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6j infectados por *Plasmodium berghei* NK65 e/ou *Ascaris suum* no sétimo dia pós-infecção. A) Níveis de IL-1 β . B) Níveis de IFN- γ . C) Níveis de IL-12. D) Níveis de IL-6. E) Níveis de IL-17. F) Níveis de IL-4. G) Níveis de IL-5. H) Níveis de IL-13. I) Níveis de IL-10. J) Níveis de TGF- β . O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são apresentados em média \pm SEM e foram representados pelos símbolos (*) nos gráficos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Em conjunto, os dados obtidos neste capítulo sugerem que a coinfeção simultânea pelo *P. berghei* NK65 e *A. suum* em camundongos C57BL/6j compromete a funcionalidade do fígado e dos pulmões e isso está ligado à presença da inflamação crescente por conta da passagem das larvas do helminto e das inúmeras multiplicações do plasmódio e fenômenos associados à presença desses parasitos, que tendem a inibir qualquer tipo de resposta, implicando no comprometimento sistêmico do animal. Isso se tornou evidente quando constatamos a regulação negativa para todos os perfis de citocina no parênquima pulmonar,

que resultou no agravamento da ventilação dos animais coinfectados e consequente morte dos animais.

6. DISCUSSÃO

6.1. O MODELO EXPERIMENTAL DE MALÁRIA GRAVE POR *Plasmodium berghei* NK65

Muito se discute sobre a contribuição dos modelos experimentais na compreensão da malária humana, visto que nem todos os aspectos da doença são compartilhados entre esses hospedeiros. Contudo, também existem divergências quanto às características das cepas de plasmódios utilizadas nos estudos experimentais, dificultando a padronização do modelo de infecção que permita a análise de aspectos específicos da doença (HEY, 1999; CRAIG et al., 2012).

Vários estudos na literatura têm utilizado o *P. berghei* NK65 como modelo para o estudo das complicações pulmonares associada a malária (ALI-ARDS). Até o presente momento, os modelos utilizados para o estudo da ALI-ARDS são: (i) camundongos CBA/2 infectados por *P. berghei* ANKA (VAN DEN STEEN et al., 2010; CRAIG et al., 2012; AITKEN et al., 2014) e, mais frequentemente, (ii) camundongos C57BL/6 infectados por *P. berghei* NK65 (CRAIG et al., 2012; DEROOST et al., 2013; SCACCABAROZZI et al., 2015). Apesar da ampla utilização desses modelos, a descrição da malária grave pulmonar em seus aspectos fisiopatológicos, principalmente de funcionalidade pulmonar são pouco consistentes e ainda controversos (VANDERMOSTEN et al., 2018).

Na tentativa de melhor caracterizar a imunofisiopatologia do modelo experimental de malária a ser utilizado no nosso modelo de coinfecção e de acrescentar aspectos ainda não explorados pela literatura, camundongos C57BL/6j, descrita como linhagem de roedor susceptível às complicações da malária (CRAIG et al., 2012), foram infectados por *P. berghei* NK65. Os resultados do nosso estudo demonstram que animais infectados apresentaram perda de massa corporal acentuada ao longo da infecção, sendo condizente com as altas parasitemias e consequentemente, o óbito dos animais. A baixa sobrevivência dos animais infectados, associado ao aumento da carga parasitária caracterizam o perfil de malária grave, principalmente quando comparados a outros modelos experimentais, a exemplo do modelo de infecção por *P. chabaudi* em camundongos C57BL/6, em que ocorre a recuperação dos

animais após um pico inicial de parasitemia e recrudescência da cepa, não havendo complicações características da malária grave (STEVENSON et al., 1982; GEURTS et al., 2011).

Alterações hematológicas, ainda pouco exploradas nesse modelo, também foram avaliadas neste estudo, em que pudemos verificar a diminuição expressiva do número de hemácias e hemoglobina nos animais infectados, caracterizando um perfil de anemia, uma complicação comum na malária humana, principalmente em infecções por *P. vivax* (KOCHAR et al., 2009; ANDRADE et al., 2010; LANÇA et al., 2012). A anemia consiste na complicação mais frequente por malária vivax e a sua gravidade e fatalidade é mais deletéria para crianças e mulheres grávidas, assim como para as outras complicações por essa espécie (MURPHY; BREMAN, 2001; TJITRA et al., 2008; LANÇA et al., 2012).

Por a malária ser uma doença majoritariamente intravascular resultante do desenvolvimento do parasito no interior dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, durante o ciclo eritrocítico, distúrbios hematológicos podem ser decorrentes da destruição dos eritrócitos infectados. Estas células sofrem alterações estruturais, bioquímicas e funcionais que promovem o rompimento e liberação dos parasitos, assim como de seus metabólitos na circulação sanguínea (GLUSHAKOVA et al., 2005; MILLHOLLAND et al., 2011). No entanto, o processo de hemólise intravascular dos eritrócitos infectados por si só não é suficiente para explicar a patogenia da anemia na malária vivax. Isso porque os merozoítos dessa espécie tem preferência por infectar reticulócitos e a biomassa total de tais células destruídas seria facilmente repostada pela medula óssea durante o processo de eritropoiese (WICKRAMASINGLE; ABDALLA, 2000; QUINTERO et al., 2011). Além disso, a falta de correlação entre a carga parasitária e a gravidade da doença encontrada em diversos estudos reforçam a existência de outros mecanismos promotores da anemia (DONDORP et al., 1999; revisto por MUELLER et al., 2009; DOUGLAS et al., 2012). Atualmente propõem-se a existência de vários mecanismos de perda de eritrócitos tanto infectados como não infectados determinantes dos quadros de anemia na malária vivax como a diseritropoiese, causada pela produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e pelo estresse oxidativo mediados por componentes do parasito liberados na circulação (ANSTEY et al., 1999; GYAN et al., 2002; LAMIKANRA et al., 2009; LIBREGTS et al., 2011), e eritrofagocitose, estimulada pelas modificações na superfície dos eritrócitos causadas pelo parasito durante a infecção (similares

à células senescentes) (FOLLER et al., 2008; PATTANAPANYASAT et al., 2010). Contudo, os mecanismos pelos quais o parasito leva a este fenômeno não são bem elucidados.

Outro dado constatado nas análises hematológicas e que é bastante comum nas infecções maláricas por *P. falciparum* e *P. vivax*, apesar de não ser um critério para a malária grave, foi a diminuição do número de plaquetas (trombocitopenia) (RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2005; KOCHAR et al., 2010). Dentre os mecanismos especulares que levam à trombocitopenia estão: distúrbios na coagulação, esplenomegalia, alterações na medula óssea, destruição de plaquetas mediadas por anticorpos, estresse oxidativo e a agregação plaquetária (LACERDA et al., 2011; COELHO et al., 2012; DEL PORTILLO et al., 2012). Assim como a anemia, a trombocitopenia é um fenômeno pouco explorado na literatura necessitando de mais estudos para saber se esse fenômeno é a causa ou consequência do espectro da doença clínica.

A observação dos esfregaços sanguíneos analisados durante o curso da infecção sugere notada preferência dos merozoítos dessa linhagem por reticulócitos, corroborando com os dados obtidos por Vandermosten et al. (2018) neste mesmo modelo de infecção. No entanto, os resultados do nosso estudo permitem afirmar a semelhança desse modelo experimental com a malária vivax, o que não impede o desenvolvimento de complicações, uma vez que diversos estudos têm descrito diferentes aspectos associados à gravidade durante a monoinfecção por essa espécie como anemia grave, agregação de plaquetas, citoaderência no pulmão e trombocitopenia (MENDIS et al., 2001; CUI et al., 2003; PRICE et al., 2007; CARVALHO et al., 2010; VAL et al., 2017). Com base nessa discussão, foram avaliados aspectos fisiopatológicos no baço, fígado e pulmões deste modelo experimental.

A hepatoesplenomegalia verificada durante a necropsia pode ser sugestiva para o quadro de retenção do parasito nesses órgãos, uma vez que eles exercem um papel crucial na eliminação do parasito da circulação (ALVES et al., 1996; GOOD et al., 2005). Alterações na arquitetura do baço dos animais infectados por *P. berghei* NK65, demonstraram o envolvimento do órgão na patologia da doença. Essas alterações são comuns na malária humana e tem sido estudada em diferentes modelos experimentais (ENGWERDA et al., 2005; DEL PORTILLO et al., 2012).

A patogênese da disfunção hepática na malária é complexa e não completamente compreendida. As alterações histopatológicas encontradas no tecido hepático, evidenciada pelo aumento da atividade celular no órgão, confirmam o intenso dano hepático causado no

órgão na tentativa de obter o controle da infecção. No entanto, quanto ao perfil de inflamação hepática, foram constatados aumento de atividade de macrófagos, neutrófilos e, curiosamente, de eosinófilos. O papel da eosinofilia na infecção malárica foi investigado por Zainal-Abidin et al. (1984), que revelou que camundongos infectados por *P. berghei* ao serem imunizados por antígeno bruto de verme adulto de *A. suum* são protegidos da malária, sugerindo o papel dessas células na infecção malárica. As alterações verificadas na fisiologia hepática, constatada pela alta dosagem sérica dos marcadores enzimáticos ALT e AST, foram observadas como consequência da lesão parenquimatosa intensa, sendo consistentes com o aumento da parasitemia, uma vez que níveis elevados de AST também podem refletir a hemólise, além de dano hepático (KUMAR; SHARMA, 2017). Resultado semelhante foi encontrado por Deroost et al. (2014) e Scaccabarozzi et al. (2018), no entanto, segundo esses estudos, a lesão e perda da funcionalidade hepática em camundongos C57BL/6 infectados por *P. chabaudi* eram mais pronunciadas quando comparado aos camundongos infectados pela cepa NK65 do *P. berghei*.

Notadamente, também foram observadas lesões no parênquima pulmonar, que resultaram no comprometimento da função do órgão, mensurada através de espirometria. As alterações verificadas na fisiologia pulmonar incluem perda de fluxo das vias aéreas e da elasticidade do órgão, que pode ser vista como consequência da lesão parenquimatosa, evidenciada pelo aumento de celularidade nas vias aéreas, composta majoritariamente por linfócitos, e macrófagos. O recrutamento celular para o órgão, principalmente na fase inicial da infecção, pode ter contribuído para alteração da permeabilidade vascular, visto pelos níveis ligeiramente aumentados de proteínas e hemoglobina das vias aéreas. A perda de integridade endotelial é um mecanismo resultante da aderência de hemácias infectadas e leucócitos no vaso, na fase inicial do processo inflamatório (AIRD et al., 2014; BERNABEU; SMITH, 2017). Estudos utilizando o extravasamento de corantes para o parênquima tecidual têm demonstrado que a permeabilidade vascular é marcadamente aumentada no cérebro e nos pulmões de animais infectados por *P. berghei*, comprovando a importância desse evento para a patogênese da malária grave (NEILL; HUNT, 1992; VAN DE HEYDE et al., 2001; VAN DEN STEEN et al., 2010; NACER et al., 2012). Desta forma, não podemos descartar o envolvimento pulmonar nestes animais, em conjunto com outras repercussões acarretadas pela infecção.

Neste sentido, cabe ressaltar a importância da hemozoína, bem como outros componentes do parasito (não investigados neste trabalho), liberados após a ruptura dos eritrócitos infectados, como potencial envolvido na produção de resposta inflamatória, uma vez que o pigmento malárico se fez presente em todos os órgãos analisados neste trabalho. Essas moléculas participam na ativação de células dendríticas e macrófagos via interação com TLR9, aumentando a produção de citocinas inflamatórias tais como IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e IL-12 (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2002; COBAN et al., 2005; PARROCHE et al., 2007). A participação da hemozoína como causa das complicações hepática e pulmonar tem sido relatada neste, e em outros modelos de malária experimental (DEROOST et al., 2013, 2014).

A produção de citocinas inflamatórias exerce um controle da parasitemia na fase inicial da infecção (MILLER et al., 2002; GOOD et al., 2005). Essas citocinas agem sinergicamente, otimizando a produção de reativos de oxigênio e nitrogênio, que estão associados à morte do parasito (JACOBS et al., 1996). Entretanto, a produção excessiva desses mediadores inflamatórios no sítio de infecção pode exercer um importante papel na patogenia da doença (SCHOFIELD; GRAU, 2005; PHILLIPS et al., 2017). Um balanço delicado entre a resposta imunológica Th1 e Th2 é necessário para que ocorra a destruição do parasito sem que gere complicações para o hospedeiro, sugerindo que o tempo e a intensidade da resposta sejam cruciais na determinação do resultado da infecção (GOOD et al., 2005; RILEY et al., 2006; LANGHORNE et al., 2008). Neste trabalho, verificou-se a detecção de níveis aumentados de citocinas de perfil Th1, definida por elevados níveis teciduais de IL-1 β , IFN- γ e IL-12, e consequente regulação negativa das citocinas Th2 no parênquima pulmonar dos animais infectados por *P. berghei* NK65. No entanto, a baixa produção da citocina IL-6 em ambos os tempos da infecção foi contrária ao encontrado por Wunderlich et al. (2012), que mostrou que camundongos deficientes em IL-6RA tendem a ter maior letalidade induzida pela malária, precedida por um aumento da resposta inflamatória. Além disso, os baixos níveis de IL-6 e de TGF- β podem explicar a baixa produção de IL-17, uma vez que essas citocinas agem sinergicamente promovendo o desenvolvimento de células Th17 (HARRINGTON et al., 2006; VELDHOEN et al., 2006). Contudo, cabe ressaltar a insuficiente regulação dessa resposta inflamatória nos animais infectados uma vez que não houve participação expressiva da citocina imunorregulatória IL-10.

Os mecanismos de regulação são de extrema importância na prevenção de danos mais intensos aos órgãos, desde que a parasitemia seja controlada pela resposta inflamatória efetora. Essa regulação também poderia causar a supressão de células T tanto para antígenos de malária quanto para antígenos não relacionados, o que é frequentemente observado em populações expostas ao *Plasmodium* e em coinfeções (GREENWOOD et al., 1972; WHITWORTH et al., 2000; BRAGA et al., 2002). As células dendríticas, células T reguladoras, e a própria produção de citocinas imunossupressoras podem ter papel fundamental nessa regulação da resposta imune inflamatória exacerbada que ocorre em indivíduos que desenvolvem malária grave (RILEY et al., 2006; WYKES; GOOD, 2008; WALTHER et al., 2009; HANSEN et al., 2010).

Contudo, a diminuição dos níveis de hemoglobina e proteína total nas vias aéreas e a baixa atividade celular nos pulmões no vigésimo dia pós-infecção, pode ser interpretado como consequência de um desordenamento da resposta imunológica, resultando num processo semelhante a sepse (HOTCHKISS et al., 2009; PHILLIPSON; KUBES, 2011). Esse processo pode ser explicado por alguns mecanismos já relatados na literatura como a perda das funções fagocíticas e da capacidade de gerar intermediários de oxigênio dos macrófagos após a ingestão do pigmento malárico (SCHWARZER et al., 1992; SCHWARZER; ARESE, 1996; CUNNINGTON et al., 2012), bem como a maturação afetada de células dendríticas (DCs) infectadas por parasitos da malária, impactando na capacidade dessas células na estimulação das respostas de células T, levando à redução da resposta protetiva e na indução do fenótipo de células T tolerantes (URBAN et al., 1999; VALLEJO et al. 2018). Baseados nessa discussão, nossos resultados sugerem que ocorra uma produção exacerbada de citocinas inflamatórias no início da infecção que logo saturam o sistema imunológico, tornando o animal não responsivo e vulnerável a infecções secundárias, levando a óbito.

Em suma, a caracterização desse modelo experimental foi de fundamental importância para que, baseado nas características desse parasito, fosse possível a padronização do modelo experimental de coinfeção. Uma vez que o pulmão também é um órgão acometido durante a migração larval de muitos helmintos, em especial, do *A.suum*. O que torna interessante o entendimento da interação concomitante entre esses parasitos.

6.2. O MODELO DE COINFECCÃO EXPERIMENTAL POR *Ascaris suum* E *Plasmodium berghei* NK65

O presente estudo foi delineado e realizado, como um trabalho pioneiro, para avaliar o impacto da infecção inicial por *A. suum*, em uma provável infecção malárica concomitante. Inúmeros estudos já demonstraram a capacidade dos helmintos em alterar o curso de infecções por vírus, protozoários, bactérias e fungos, no entanto, a influência da infecção por *A. suum* em outras infecções, precisa ser elucidado (PALMER et al., 1995; GEIGER et al., 2002; BRADLEY; JACKSON, 2004; HARTGERS; YAZDANBAKHS, 2006; NACHER, 2011; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2017). A infecção intraperitoneal por *P. berghei* NK65 afeta sistematicamente o hospedeiro, em especial, fígado e pulmões, órgãos de extrema importância para geohelmintos como *Ascaris* spp., uma vez que a migração de larvas durante a fase aguda da infecção ocorre nesses sítios.

Diante do exposto, o primeiro cenário observado sobre a infecção concomitante por *A. suum* e *P. berghei* NK65 revela que a coinfeccção representa um sério risco para o hospedeiro. Os principais resultados demonstraram que a coinfeccção induziu morbidade e alta mortalidade precoce em comparação com as monoinfecções. Manifestações clínicas típicas da infecção malárica somados à nítida dificuldade respiratória, bem como a perda de peso mais acentuada e precoce, revela o agravamento do quadro clínico dos animais na coinfeccção. No entanto, é importante frisar que a monoinfecção por *A. suum* também exibe morbidade sobre os animais infectados, constatada pela perda de massa corporal e a dificuldade respiratória dos animais, associado a quadro asmático, mas que é recuperada após a passagem larval do helminto no camundongo, evento comum nesse modelo de infecção (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). A morbidade associada ao processo migratório de larvas também está presente em infecções humanas e define a fase aguda da ascarirose (HERRERA; MENESES, 2005; CHITKARA; KRISHNA, 2006; DOLD; HOLLAND, 2011a; HOENIGL et al., 2011).

Ao avaliar o perfil hematológico dos animais coinfectados, notamos um aumento significativo do número total de leucócitos circulantes, caracterizados por populações de linfócitos, monócitos e neutrófilos. Como esperado, as contagens de eosinófilos foram significativamente aumentadas nos animais monoinfectados por *A. suum*, uma vez que esse tipo celular é importante na resposta protetora contra o *Ascaris* bem como para outros

helminthos (ANTHONY et al., 2007; KITA, 2011; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2016). Além disso, a redução significativa da contagem de eritrócitos totais, dos níveis de hemoglobina e de plaquetas na coinfeção, tem relação direta com a dinâmica malárica de infecção, pela constante ruptura de hemácias durante o ciclo eritrocítico do parasito; e pela destruição de hemácias infectadas e não infectadas, plaquetas e de outros componentes sanguíneos no baço e no fígado (ALVES et al., 1996; GOOD et al., 2005; PATTANAPANYASAT et al., 2010; LIBREGTS et al., 2011; DEL PORTILLO et al., 2012).

A possível explicação para esse fenômeno vem dos resultados obtidos pela análise da carga parasitária helmíntica no pulmão de animais coinfectados e monoinfectados por *A. suum*, a qual determinou a gravidade e o curso da coinfeção. A presença do plasmódio no endotélio pulmonar induziu um aumento significativo de larvas de *A. suum* migrando pelos pulmões, que resultou na morte dos animais coinfectados. Por outro lado, não houveram alterações da parasitemia do *Plasmodium* em relação ao grupo monoinfectado, o que indica modulação do plasmódio sobre a infecção helmíntica.

Os nossos resultados de carga parasitária diferem do encontrado por Gazzinelli-Guimarães et al. (2017), uma vez que a coinfeção favoreceu a replicação do Vaccinia vírus, acarretando na diminuição do número de larvas recuperadas do pulmão. Outro dado similar foi descrito por Mueller et al. (2012) em modelo de coinfeção por *Mycobacterium tuberculosis* e *P. berghei* NK65, em que houve aumento da carga bacteriana no pulmão e no baço dos animais coinfectados e diminuição da parasitemia do plasmódio. Por outro lado, Ademola e Odeniran (2016) mostraram que coinfeção por *P. berghei* e *Trypanosoma brucei* levou a altas parasitemias para ambos os protozoários o que consequentemente aumentou a mortalidade dos animais. Outro contexto foi descrito por Wang et al. (2014) que verificaram que a coinfeção com um inóculo maior de *Schistosoma japonicum* propicia o aumento da parasitemia do *P. berghei* ANKA, mas que melhora a taxa de sobrevivência dos animais coinfectados se comparada a coinfeção com menor inóculo de cercárias. Dado similar ao encontrado por Bucher et al. (2011) que revela que na coinfeção por *S. mansoni* e *P. berghei* ANKA ocorre um aumento da parasitemia do plasmódio, mas que não resulta na proteção contra a morbidade e mortalidade associada a doença, no entanto preveniu a malária cerebral. Ademais, Craig e Scott (2017) mostraram em modelo de coinfeção com infecção prévia por *Nippostrongylus brasiliensis* induz o aumento da parasitemia, perda de peso similar aos animais monoinfectados por *P. berghei* ANKA e

mortalidade acelerada. Por fim, Moriyasu et al. (2018) demonstrou parasitemia reduzida no fígado de animais coinfectados por *S. mansoni* e *P. yoelii*, mas isso não alterou a taxa de mortalidade dos animais coinfectados. Portanto, o desfecho das coinfeções experimentais por protozoários e helmintos são dependentes das espécies dos parasitos envolvidos, do inóculo da infecção e do tempo relativo da infecção de cada parasito (CHRISTENSEN et al. 1988; WANG et al. 2014; GRIFFITHS et al., 2015).

Após demonstrar o negativo impacto para o hospedeiro entre a associação *Ascaris-Plasmodium*, o próximo passo foi o entendimento da fisiopatologia dos pulmões, fígado e baço dos animais coinfectados. Em primeira instância, as análises histopatológicas do fígado revelaram que a coinfeção gera uma intensa inflamação no parênquima hepático, apesar de não ter sido encontrado diferenças significativas na contagem de larvas recuperadas do fígado. A hemorragia, a inflamação de perfil misto e as zonas de necrose que caracterizam a lesão hepática na coinfeção, deixou clara a influência de ambos os parasitos, evidenciados pela constante migração hepatopulmonar de larvas e conseqüente inflamação, também estimulada por antígenos liberados das hemácias infectadas pelo plasmódio (DEROOST et al., 2014; SCACCABAROZZI et al., 2018). Nesse contexto, a coinfeção resultou em alterações significativas na fisiologia hepática, consistentes com as altas concentrações das enzimas plasmáticas AST e ALT. No entanto, quanto ao perfil de inflamação hepática, foram constatados somente a atividade N- acetilglicosaminidase de macrófagos, o que não descarta a participação de linfócitos na coinfeção, visto que essas células desempenham importante papel na resposta protetora contra o plasmódio (DOOLAN; HOFFMAN 2000; GOOD et al., 2005); mas que também pode contribuir para garantia da sobrevivência do helminto no hospedeiro durante o estágio de migração larval (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013). Como esperado, a atividade de macrófagos e eosinófilos foi bastante aumentada na monoinfecção por *Ascaris*, tais dados já foram discutidos em estudos anteriores do nosso grupo (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2016).

As análises da histopatologia pulmonar revelaram a presença de áreas lesionadas marcadas por intensa hemorragia e edema, consistentes com os elevados níveis de hemoglobina e proteína total nas vias aéreas. No entanto, houve pouca inflamação, visto pela baixa celularidade do BAL e pela pouca atividade de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos no órgão. Em contraste, a lesão pulmonar causada na monoinfecção por *A. suum* foi condizente com maior recrutamento de células nas vias aéreas, especialmente de eosinófilos. Esse

resultado já era esperado, uma vez que o modelo de ascaridose larval é caracterizado por uma intensa inflamação das vias aéreas, importante para o controle de larvas migrantes (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013).

Apesar da pouca inflamação no parênquima pulmonar, a hemorragia e o edema causado pela coinfeção foi suficiente para que houvesse alterações na fisiologia pulmonar. Os resultados da análise espirométrica revelou maior comprometimento funcional do pulmão nos animais coinfectados do que os animais monoinfectados por *A. suum*, visto que animais coinfectados apresentaram alteração no fluxo de ar nas vias aéreas, perda da área respiratória, redução da elasticidade do tecido e, conseqüentemente, a diminuição do volume pulmonar.

Diante desses resultados, é notável que o comprometimento da resposta imunológica esteja diretamente relacionado ao aumento da carga parasitária larval e conseqüentemente da perda da função do órgão, bem como o agravamento dos sinais clínicos e conseqüente mortalidade dos animais coinfectados. Visando o maior entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na interação *Ascaris-Plasmodium*, avaliamos a resposta imunológica celular tecidual desses animais. Os resultados desta análise sugerem regulação negativa dos perfis Th1, Th17, Th2 e Treg de resposta. Esse resultado também difere de outros estudos de coinfeção, como a inflamação exacerbada encontrada por Gazzinelli-Guimarães et al. (2017) em modelo de coinfeção por Vaccinia vírus e *A. suum*, marcada pela produção de citocinas IL-6 e IFN- γ no oitavo dia pós-infecção, e de IL-4 no décimo segundo dia pós-infecção. Por outro lado, outros trabalhos de coinfeção realizados com *Schistosoma* spp. e *P. berghei*, revelam o aumento de citocinas de perfil Th2 nos animais coinfectados (BUCHER et al., 2011; WANG et al., 2014). Uma exceção foi a citocina inflamatória IL-6, que aumentada nos animais coinfectados em relação ao grupo monoinfectado pelo plasmódio. Tal fato reforça a importância dessa citocina no controle larval, uma vez que nesse, e em trabalhos anteriores de ascaridose larval, foi demonstrado altos níveis dessa citocina em animais monoinfectados por *Ascaris* durante o pico de migração larval (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2013, 2017).

Quando avaliado a influência da infecção malárica na biologia da infecção helmíntica, os nossos dados revelaram a presença de um microambiente no pulmão, consistentemente inflamado, mesmo que de forma inespecífica, o que influenciou diretamente na carga parasitária de *Ascaris*, duplicando o número de larvas que migram pelo órgão. De acordo com trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo, a inflamação no modelo de ascaridose larval

é aumentada, e muda de configuração ao longo da migração larval (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al. 2013). Portanto, a mudança de perfil imunológico nos sítios de migração larval dos animais coinfectados pode ter contribuído para patogenia da coinfeção, resultando na mortalidade dos animais. A alteração da cinética de migração larval devido a passagem precoce de larvas no pulmão sugere esse fenômeno. Além disso, a baixa responsividade imunológica no tecido pulmonar somados ao baixo recrutamento de células nas vias aéreas podem ser explicados pelos fenômenos de exaustão/anergia, induzida pelo plasmódio como mecanismo de escape para se manter no hospedeiro (RÉNIA; GOH, 2016). Esse mecanismo implica num quadro de imunossupressão que gera ausência de resposta imunológica frente aos parasitos.

Existem fortes evidências de que *Plasmodium* spp. podem modular as respostas imunes, interferindo na maturação das células apresentadoras de antígenos (APCs), prejudicando principalmente a função de células dendríticas (DC), resultando na indução do fenótipo de células T tolerantes (URBAN et al., 1999; VALLEJO et al. 2018). A ativação de células mononucleares durante a infecção malárica no sangue também pode resultar em apoptose em monócitos, células B, células T e DCs (TOURE et al., 1996; HELMBY et al., 2000; MATSUMOTO et al., 2000; WYKES et al., 2005; WOODBERRY et al., 2012; PINZON-CHARRY et al., 2013). Por outro lado, as células T ($\alpha\beta$ e $\gamma\delta$) e B ativadas cronicamente durante infecções sanguíneas prolongadas ou múltiplas reinfecções também podem entrar em uma fase de anergia e/ou exaustão (THEANDER et al., 1986; MARTINI et al., 2003; ILLINGWORTH et al. 2013; ALVES et al., 2015). Ademais, numerosos estudos demonstram o potencial de ativação de moléculas inibidoras do tipo *checkpoint* na infecção por *Plasmodium* spp. como a proteína 1 de morte celular programada (PD-1), o ligante 1 de morte programada (PD-L1), PD-L2, o gene 3 de ativação de linfócitos (LAG-3) e o linfócito T citotóxico antígeno-4 (CTLA-4) em células T CD4⁺ e CD8⁺ (BUTLER et al., 2012; HORNE-DEBETS et al., 2013; KARUNARATHNE et al., 2016; KURUP et al., 2017).

Contudo, a esplenomegalia verificada durante a necropsia, somadas aos resultados obtidos das análises histopatológicas do baço sugerem a constante ativação celular, evidenciada pela presença de hipertrofia e hiperplasia de todos os nódulos linfáticos, proliferação das regiões B e T dependente, além de numerosos macrófagos apresentando citoplasma contendo pigmento malárico. Portanto, o papel dos linfócitos e os mecanismos que subsidiam o agravamento do hospedeiro durante a coinfeção precisam ser elucidados.

Em contrapartida, quando avaliado a influência da infecção helmíntica na biologia da infecção malárica, os dados revelaram que a presença de um microambiente no pulmonar intensamente lesionado, com a presença de inflamação provocada pelo processo troca do tegumento das larvas, e pela lesão provocada durante a migração, além da influencia de antígenos secretado/excretado pelo helminto, que também podem ter tido influência no curso da infecção (BRADLEY; JACKSON, 2004; HEWITSON et al., 2009; JEX et al., 2011; SCHWARTZ et al., 2018).

Levando todas essas análises e discussões em consideração, o presente estudo sugere que a ascaridose pulmonar associada à infecção malárica é letal para o hospedeiro, e a biologia da coinfeção é caracterizada pelo aumento de larvas recuperadas no pulmão, revelando uma mudança na cinética da infecção, que ocasionou no aumento de lesão hepática e pulmonar acarretando na funcionalidade desses órgãos (figura 44). Tais processos ocorreram em virtude da constante exposição à antígenos na circulação e nos órgãos afetados e da modulação causada por ambos os parasitos, refletindo na grave morbidade e mortalidade dos animais.

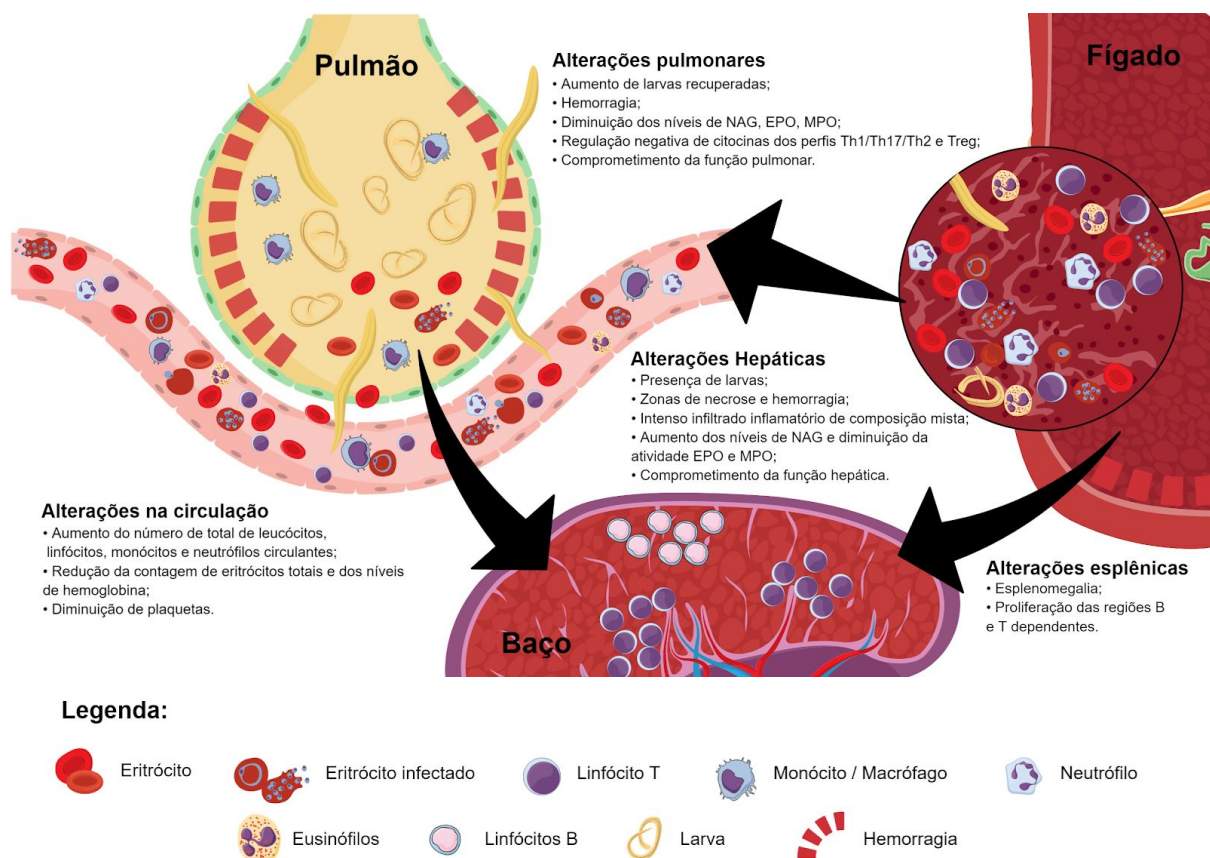


Figura 44: Modelo representativo com principais alterações fisiopatológicas e imunológicas da coinfeção experimental por *Ascaris suum* e *Plasmodium berghei*. Fonte: Própria.

Extrapolando para o cenário atual e natural, este trabalho fornece evidências de como a coinfeção por helmintos e protozoários, podem influenciar negativamente o curso das monoinfecções isoladas e mais ainda, podem potencialmente impactar na saúde pública de áreas endêmicas geograficamente sobrepostas para ambos patógenos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nessa dissertação de mestrado, sugerem que ocorre modulação da resposta imune pelo *Plasmodium berghei* NK65 durante a coinfeção experimental concomitante por *Ascaris suum*. A lesão hepática intensa somados a lesão parenquimatosa do pulmão, causada pelo comprometimento da resposta imunológica dos animais coinfectados, são evidências de um processo avançado de sepse em decorrência de uma alta inflamação ocorrida a priori, resultando na morte precoce dos animais. Neste sentido, torna-se necessário maior entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na coinfeção, visando o entendimento do papel de linfócitos e de macrófagos na patologia pulmonar durante a coinfeção por esses parasitos.

8. REFERÊNCIAS

- ABANYIE, F. A.; MCCRACKEN, C.; KIRWAN, P.; MOLLOY, S. F.; ASAOLU, S. O.; et al. Ascaris co-infection does not alter malaria-induced anaemia in a cohort of Nigerian preschool children. **Malar. J.** 12: 1, 2013.
- ADAMS, S; BROWN, H; TURNER, G. Breaking down the blood–brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? **Trends in parasitology.** 18 (8): 360-366, 2002.
- ADAMS, J. H.; SIM, B. K.; DOLAN, S. A.; FANG, X.; KASLOW, D. C.; MILLER, L. H. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc. nat. acad. sci.** 89: 7.085-7.089, 1992.
- ADAMS, S.; TURNER, G. D.; NASH, G. B.; MICKLEM, K.; NEWBOLD, C. I.; CRAIG, A. G. Differential binding of clonal variants of *Plasmodium falciparum* to allelic forms of intercellular adhesion molecule 1 determined by flow adhesion. **Infect. Immun.** 68: 264-269, 2000.
- ADEMOLA, I. O.; ODENIRAN, P. O. Co-infection with *Plasmodium berghei* and *Trypanosoma brucei* increases severity of malaria and trypanosomiasis in mice. **Acta Tropica.** 159, 29–35, 2016.
- AIRD, W. C.; MOSNIER, L. O.; FAIRHURST, R. M. *Plasmodium falciparum* picks (on) EPCR. **Blood.** 123(2): 163-167, 2014.
- AKIRA, S., TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.** 4:499-511, 2004.
- ALBONICO, M.; MONTRESOR, A.; CROMPTON, D. W.; SAVIOLI, L. Intervention for the control of soil-transmitted helminthiasis in the community. **Adv. Parasitol.** 61: p. 311-48, 2006.
- ALEMU, A.; SHIFERAW, Y.; AMBACHEW, A.; HAMID, H. Malaria helminth co-infections and their contribution for anaemia in febrile patients attending Azzezo health center, Gondar, Northwest Ethiopia: a cross sectional study. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.** 803-809, 2012.
- ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nat Rev Immunol.** 11(6): 375-88, 2011.
- ALVES, F. A.; PELAJO-MACHADO, M.; TOTINO, P. R.; SOUZA, M. T.; GONCALVES, E. C.; SCHNEIDER, M. P.; et al. Splenic architecture disruption and parasite-induced splenocyte activation and anergy in *Plasmodium falciparum*-infected Saimiri sciureus monkeys. **Malar. J.** 14:128, 2015.

- ALVES, H. J.; WEIDANZ, W.; WEISS, L. The spleen in murine *Plasmodium chabaudi* adami malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. **Am J Trop Med Hyg.** 55(4): 370-378, 1996.
- AMINO, R.; THIBERGE, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. **C. R. Biol.** 329: 858-862, 2006.
- AMINO, R.; GIOVANNINI, D.; THIBERGE, S.; GUEIRARD, P.; BOISSON, B. et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. **Cell Host Microbe.** 3: 88–96, 2008.
- ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S.; CLARENCIO, J.; CAMARGO, L. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malar. J.** 9: 13, 2010.
- ANDERSON, T. J. Ascaris infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. **Parasitology.** 110(2): 215–219, 1995.
- ANTHONY, R. M.; RUTITZKY, L. I.; URBAN, J. F.; STADECKER, M.J.; GAUSE, W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nat. Rev. Immunol.** 7: 975–987, 2007.
- ANSTEY, N. M., GRANGER, D. L.; HASSANALI, M. Y.; MWAIKAMBO, E. D.; DUFFY, P. E.; WEINBERG, J. B. Nitric oxide, malaria, and anemia: Inverse relationship between nitric oxide production and hemoglobin concentration in asymptomatic, malaria-exposed children. **The American Journal of Tropical Medicine.** 61: 249-252, 1999.
- ARINOLA, O. G. Leucocyte phagocytosis in children with urinary schistosomiasis and asymptomatic malaria parasitemia. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology.** 6 (2): 81–86, 2005.
- ARIZONO, N., YOSHIMURA, Y., TOHZAKA, N., YAMADA, M., TEGOSHI, T., ONISHI, K., UCHIKAWA, R. Ascariasis in Japan: is pig-derived Ascaris infecting humans? **Jpn. J. Infect.** 63: 447–448, 2010.
- AHMED, M. M. et al. Ascariasis presenting as hematemesis in a young boy. **J. Health Res. Rev.** 2: 37-8, 2015.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; TONGREN, J. E.; RILEY, E. M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clin Exp Immunol.** 133: 145–152, 2003.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J. Immunol.** 169: 2956-2963, 2002.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; TONGREN, J. E.; RILEY, E. M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clinical e Experimental Immunology**. 133(2): 145-152, 2003.

ARTIS, D.; GRENCIS, R. K., The intestinal epithelium: sensors to effectors in nematode infection. **Mucosal Immunol**. 1(4): 252-64, 2008.

ANSEL, M.; THIBAUT, M. Value of the specific distinction between *Ascaris lumbricoides* Linnaeus 1758 and *Ascaris suum* Goeze 1782. **Int J Parasitol**. 3: 317-319, 1973.

ASIF, M. et al. Biliary ascariasis - Atypical infestation of *Ascaris lumbricoides*. **Int J Surg Pakistan**. 19(3): 123-24, 2014.

AZHAR, M. et al. Case report: Hepatobiliary ascariasis complicated by pancreatitis. **J Ayub Med Coll Abbottabad**. 27(2): 479-81, 2015.

BACHOFEN, M.; WEIBEL, E. R. Alterations of the Gas Exchange Apparatus in Adult Respiratory Insufficiency Associated with Septicemia. **American Review of Respiratory Disease**. 116(4): 589–615, 1977.

BARBALAT, R.; EWALD, S. E.; MOUCHESS, M. L.; BARTON, G. M. Nucleic acid recognition by the innate immune system. **Annu. Rev. Immunol**. 29, 185-214, 2011.

BANSAL, A.; MOLINA-CRUZ, A.; BRZOSTOWSKI, J.; LIU, P.; LUO, Y.; GUNALAN, K.; LI, Y.; RIBEIRO, J. M. C.; MILLER, L. H. PfCDPK1 is critical for malaria parasite gametogenesis and mosquito infection. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 115: 774 –779, 2018.

BARILLAS-MURY, C.; KUMAR, S. Plasmodium-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. **Cell Microbiol**. 7: 1.539-1.345, 2005.

BARRETO, M. L. et al. Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. **Environ. Health Perspect**. 118(11): 1637-42, 2010.

BARSOUM, R. S. Malarial acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**. 11(11): 2147-2154, 2000.

BARTOLONI, A.; e ZAMMARCHI, L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**. 4(1), 2012.

BEJON, P.; WILLIAMS, T.N.; LILJANDER, A.; NOOR, A.M.; WAMBUA, J.; OGADA, E.; OLOTU, A.; OSIER, F.H.; HAY, S.I.; FÄRNERT ,A.; MARSH, K. Stable and unstable malaria hotspots in longitudinal cohort studies in Kenya. **PLoS medicine**. 7 (7): 915, 2010.

BERNABEU, M.; SMITH, J. D. EPCR and malaria severity: the center of a perfect storm. **Trends Parasitol**. 33, 295–308, 2017.

- BETSON, M. et al. Molecular epidemiology of Ascariasis: A global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. **J. Infect. Dis.** 210: 932-94, 2014.
- BETSON, M.; NEJSUM, P.; BENDALL, R. P.; DEB, R. M.; STOTHARD, J. R. Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. **J. Infect. Dis.** 210 (6): 932-41, 2014.
- BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S. M.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P. J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet.** 9521 (367): 1521-32, 2006.
- BHUTTA, Z. A.; SOMMERFELD, J.; LASSI, Z. S.; SALAM, R. A.; DAS, J. K. Global burden, distribution, and interventions for infectious diseases of poverty. **Infect. Dis. Poverty.** 3: 21, 2014.
- BLAXTER, M.; KOUTSOVOULOS, G. The evolution of parasitism in Nematoda. **Parasitology.** 142: S26-39, 2015. Suplemento 1.
- BOEL, M.; CARRARA, V. I.; RIJKEN, M. et al. Complex interactions between soil-transmitted helminths and malaria in pregnant women on the Thai-burmese border. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** 4(11): e887, 2010.
- BOES, J, ERIKSEN, L., NANSEN, P. Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs isolated from worms expelled by pigs treated with albendazole, pyrantel pamoate, ivermectin or piperazine dihydrochloride. **Vet. Parasitol.** 75, 181–190, 1998.
- BOES, J.; HELWIGH, A. B. Animal models of intestinal nematode infections of humans. **Parasitology.** 121, S97–S111, 2000.
- BOUHAROUN-TAYOUN, H.; OEUVRAY, C.; LUNEL, F.; DRUILHE, P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **The Journal of experimental medicine.** 182(2): 409-418, 1995.
- BRADLEY, J. E.; JACKSON, J. A. Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. **Parasite Immunol.** 26 (11-12): 429-41, 2004.
- BRAGA, E. M.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U. Low cellular response in vitro among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 66:299-303, 2002.
- BRASIL. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária.** Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 112 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico.** 2018a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletins e mapas interativos - Região Amazônica**. 2018b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletins e mapas interativos - Malária nas fronteiras e importada de outros países**. 2018c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2005.

BROOKER, S. Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: adding up the numbers—a review. **Int. J. Parasitol.** 40: 1137-1144, 2010.

BROOKER, S.; AKHWALE, W.; PULLAN, R.; ESTAMBALE, B.; CLARKE, S. E.; SNOW, R. W. HOTEZ, P. J. Epidemiology of Plasmodium-helminth co-infection in Africa: population at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2007.

BROOKER, S. et al. Spatial analysis of the distribution of intestinal nematode infections in Uganda. **Epidemiol. Infect.** 132(6):1065-71, 2004.

BROOKER, S.; CLEMENTS, A. C. A.; HOTEZ, P. J. et al., The codistribution of *Plasmodium falciparum* and hookworm among African schoolchildren. **Malar. J.** 5(99), 2006.

BROOKER, S. J.; PULLAN, R. L.; GITONGA, C. W. et al., Plasmodium-helminth coinfection and its sources of heterogeneity across East Africa. **The Journal of Infectious Diseases.** 205: (5): 841–852, 2012.

BROWN, H. W. Parasites and Parasitism. **Am. J. Public. Health Nations Health.** 47(3): 378–379, 1957.

BRUCE-CHWATT, L. J. In: **Essential Malariology**. 2 ed., Willian Heisemann Medical Books, Londres. 1985.

BRUTUS, L.; WAITIER, L.; HANITRASOAMAMPIONONA, V.; RAZANATSOARILALA, H.; COT, M. Confirmation of the protective effect of *Ascaris lumbricoides* on *Plasmodium falciparum* infection: results of a randomized trial in Madagascar. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 77: 1091–1095, 2007.

BUCHER, K.; DIETZ, K.; LACKNER, P. et al. Schistosoma co-infection protects against brain pathology but does not prevent severe disease and death in a murine model of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology.** 41 (1): 21–31, 2011.

BUDISCHAK, S. A.; WIRIA, A. E.; HAMID, F.; WAMMES, L. J.; KAISAR, M. M. M.; VAN LIESHOUT, L.; et al. Competing for blood: the ecology of parasite resource competition in human malaria-helminth co-infections. **Ecol. Lett.** 21: 536–545, 2018.

- BUENO, L. L.; MORAIS, C. G.; ARAÚJO, F. F.; GOMES, J. A. S.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. *Plasmodium vivax*: Induction of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Regulatory T Cells during Infection Are Directly Associated with Level of Circulating Parasites. **PLoS ONE**. 5(3): e9623, 2010.
- BUTLER, N. S.; MOEBIUS, J.; PEWE, L. L.; TRAORE, B.; DOUMBO, O. K.; TYGRET, L. T.; et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established bloodstage *Plasmodium* infection. **Nat. Immunol.** 13:188–95, 2012.
- CAMPBELL, S. J.; NERY, S. V.; DOI, S. A.; GRAY, D. J.; SOARES, MAGALHÃES, R. J.; MCCARTHY, J. S. et al. Complexities and Perplexities: A Critical Appraisal of the Evidence for Soil-Transmitted Helminth Infection- Related Morbidity. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 10(5): e0004566, 2016.
- CAMUS, D.; HADLEY, T. J. A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. **Science**. 230: 553-556, 1985.
- CARLTON, J. M.; ANGIUOLI, S. V.; SUH, B. B.; KOOIJ, T. W.; PERTEA, M.; SILVA, J. C.; ERMOLAEVA, M. D. et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. **Nature**. 419, 512–519, 2002.
- CARTER, L. M.; POLLITT, L. C.; WILSON, L. G.; REECE, S. E. Ecological influences on the behaviour and fertility of malaria parasites. **Malar. J.** 15:220, 2016.
- CARTER, R.; DIGGS, C.L (1977) **Plasmodia of rodents**. In: Parasitic Protozoa, vol. III. Pp 359-465.
- CARTER, R.; MENDIS, K. N. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. **Clin. Microbiol. Rev.** 15 (4): 564-594, 2002.
- CARVALHO, B. O.; LOPES, S. C.; NOGUEIRA, P. A.; ORLANDI, P. P.; BARGIERI, D. Y.; BLANCO, Y. C.; MAMONI, R.; LEITE, J. A.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. **J. Infect. Dis.** 202: 638-647, 2010.
- CERUTTI, A.; PUGA, I.; COLS, M., Innate control of B cell responses. **Trends Immunol.** 32(5): 202-11, 2011.
- CHAMMARTIN, F. et al. Modelling the geographical distribution of soil-transmitted helminth infections in Bolivia. **Parasit. Vectors.** 5 (6): 152, 2013.
- CHAMMARTIN, F. et al. Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. **Parasites Vect.** 7: 440, 2014.
- CHAN, M. S. The global burden of intestinal nematode infections: fifty years on. **Parasitol Today.** 13:438–43, 1997.

- CHANG, K.; STEVENSON, M. M. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. **International journal for parasitology**. 34: (13): 1501-1516, 2004.
- CHAUHAN, V. et al. Ascariasis as a cause of hepatic abscess: A report of 3 cases. **Indian J Med Microbiol**. 33: 427-9, 2015.
- CHEN, F.; LIU, Z.; WU, W.; ROZO, C.; BOWDRIDGE, S.; MILLMAN, A. et al. An essential role for Th2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. **Nat. Med.** 18: 260-6, 2012.
- CHITKARA, R. K.; KRISHNA, G. Parasitic pulmonary eosinophilia. **Semin. Respir. Crit. Care Med**. 27(2):171-84, 2006.
- CHIZZOLINI, C., TROTTEIN, F., BERNARD, F. X., KAUFMANN, M. H. Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Gabonese newborns. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 45: 57-64, 1991.
- CHRISTENSEN, N. O.; FURU, P.; KURTZHALS, J.; ODAIBO, A. Heterologous synergistic interactions in concurrent experimental infection in the mouse with *Schistosoma mansoni*, *Echinostoma revolutum*, *Plasmodium yoelii*, *Babesia microti*, and *Trypanosoma brucei*. **Parasitol. Res.** 74: 544–551, 1998.
- CLARK, I. A.; BUDD, A. C.; ALLEVA, L. M.; COWDEN, W. B. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malar. J.** 5: 85, 2006.
- CLERICI, M.; SHEARER, G.M. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. **Immunology Today**. 15 (12): 575-581, 1994.
- COBAN, C.; ISHII, K. J.; KAWAI, T.; HEMMI, H.; SATO, S.; UEMATSU, S.; YAMAMOTO, M.; TAKEUCHI O.; ITAGAKI, S.; KUMAR, N. et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **J. Exp. Med.** 201: 19-25, 2005.
- COELHO, H. C.; LOPES, S. C.; PIMENTEL, J. P.; NOGUEIRA, P. A.; COSTA, F. T.; SIQUEIRA, A. M.; et al. Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria is related to platelets phagocytosis. **PLoS One**. 8(5): e63410, 2013.
- COHEN, C.; KARSTAEDT, A.; FREAN, J.; THOMAS, J.; GOVENDER, N. et al. Increased prevalence of severe malaria in HIV-infected adults in South Africa. **Clin Infect Dis**. 41: 1641–1647, 2005.
- COHEN, S.; BUTCHER, G. A. Serum antibody in acquired malarial immunity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 65:125-135, 1971.

COHEN, S.; MCGREGOR I. A.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**. 192, 733-737, 1961.

COOPER, P. J.; SANDOVAL, C.; ESPINEL, I.; GUEVARA, A.; KENNEDY, M. W.; URBAN JR, J. F.; GRIFFIN, G. E.; NUTMAN, T. B. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. **J Infect Dis**. 182 (4): 1207-13, 2000.

COOPER, P. J. et al. Atopic phenotype is an important determinant of immunoglobulin E-mediated inflammation and expression of T helper cell type 2 cytokines to *Ascaris* antigens in children exposed to ascariasis. **The Journal of Infectious Diseases**. 190(7): 1338-46, 2004.

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 & Microbe**. 2: 316-327, 2007.

COWMAN, A. F. e CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**. 124(4): 755-766, 2006.

COX, F. History of human parasitology. **Clin. Microbiol. Rev.** 15(4): 595-612, 2002.

COX-SINGH J, DAVIS TME, LEE KS, SHASUL SSG, MATUSOP A, RATNAMAS, RAHMAN HA, CONWAY DJ, SINGH B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infectious Disease**. 46: 165-171, 2008.

CRAIG, A. G.; GRAU, G. E.; JANSE, C.; KAZURA, J. W.; MILNER, D. et al. The Role of Animal Models for Research on Severe Malaria. **PLoS Pathog**. 8(2): e1002401, 2012.

CRAIG, J. M.; SCOTT, A. L. Antecedent *Nippostrongylus* infection alters the lung immune response to *Plasmodium berghei*. **Parasite Immunol**. 39: e12441, 2017.

CROMPTON, D. W. *Ascaris* and ascariasis. **Adv. Parasitol**. 48: 285-375, 2001.

CROMPTON, D. W.; NESHEIM, M. C. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. **Annu. Rev. Nutr**. 22: 35-59, 2002.

CUI, L.; ESCALANTE, A. A.; IMWONG, M.; SNOUNOU, G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. **Trends Parasitol**. 19: 220-226, 2003.

CUNNINGTON, A. J.; NJIE, M.; CORREA, S.; TAKEM, E. N.; RILEY, E. M.; WALTHER, M. Prolonged neutrophil dysfunction after *Plasmodium falciparum* malaria is related to hemolysis and heme oxygenase-1 induction. **J. Immunol**. 189: 5336-46, 2012.

- DAS, B. S. Renal failure in malaria. **J. Vector Borne Dis.** 45(2): 83-97, 2008.
- DAWSON, H. D. et al. Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. **Infection and Immunity.** 73(2): 1116-28, 2005.
- DEATON, J. Fatal pulmonary edema as a complication of acute falciparum malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 19: 196–201, 1970.
- DE ALVARENGA, D.; CULLETON, R.; DE PINA-COSTA, A.; RODRIGUES, D. F.; BIANCO, C. J. R.; SILVA, S.; NUNES, A. J. D.; DE SOUZA, J. C. JR.; HIRANO, Z. M. B.; MOREIRA, S. B.; PISSINATTI, A.; DE ABREU, F. V. S.; LISBOA AREAS, A. L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; ZALIS, M. G.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; BRASIL, P.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; DE BRITO, C. F. A. An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. **Sci. Rep.** 8(1):86, 2018.
- DEL PORTILLO, H. A.; FERRER, M.; BRUGAT, T.; MARTIN-JAULAR, L.; LANGHORNE J, et al. The role of the spleen in malaria. **Cell Microbiol.** 14: 343–355, 2012.
- DEGAREGE, A.; ANIMUT, A.; LEGESSE, M.; ERKO, B. Malaria and helminth co-infections in outpatients of Alaba Kulito Health Center, southern Ethiopia: a cross sectional study. **BMC Research Notes.** 3: 143, 2010.
- DEGAREGE, A.; ANIMUT, A.; LEGESSE, M.; ERKO, B. Malaria severity status in patients with soil-transmitted helminth infections. **Acta Tropica.** 112(1): 8–11, 2009.
- DEGAREGE, A.; ERKO, B. Epidemiology of Plasmodium and helminth coinfection and possible reasons for heterogeneity. **Biomed. Res. Int.** 2016.
- DEGAREGE, A.; LEGESSE, M.; MEDHIN, G.; ANIMUT, ERKO, B. Malaria and related outcomes in patients with intestinal helminths: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases.** 12: 291, 2012.
- DEJON-AGOBÉ, J. C.; ZINSOU, J. F.; HONKPEHEDJI, Y. J.; ATEBA-NGOA, U.; EDOA J-R.; ADEGBITE, B. R. et al. *Schistosoma haematobium* effects on *Plasmodium falciparum* infection modified by soil-transmitted helminths in school-age children living in rural areas of Gabon. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 12(8): e0006663, 2018.
- DEMEURE, C. E.; BRAHIMIK, HACINI, F.; MARCHAND, F.; PERONET, R.; HUERRE, M. et al., Anopheles mosquito bites active cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. **Journal of immunology.** 174: 3932-3940, 2005.
- DERIBEW, K.; TEKESTE, Z.; PETROS, B. Urinary schistosomiasis and malaria associated anemia in Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** 3(4): 307–310, 2013.

DEROOST, K.; LAYS, N.; PHAM, T. T.; BACI, D.; VAN DEN EYNDE, K.; KOMUTA, M.; et al. Hemozoin induces hepatic inflammation in mice and is differentially associated with liver pathology depending on the *Plasmodium* strain. **PLoS One**. 9: e113519, 2014.

DEROOST, K.; TYBERGHEIN, A.; LAYS, N.; NOPPEN, S.; SCHWARZER, E.; VANSTREELS, E.; KOMUTA, M.; PRATO, M.; LIN, J. W.; PAMPLONA, A.; JANSE, C. J.; ARESE, P.; ROSKAMS, T.; DAELEMANS, D.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 48: 589-600, 2013.

DE SILVA, N. R.; BROOKER, S.; HOTEZ, P. J.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. **Trends Parasitol.** (19): p. 547-51, 2003.

DE SOUZA, J. B.; RILEY, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes Infect.** 4(3): 291-300, 2002.

DIALLO, T. O.; REMOURE, F.; GAAYEB, L.; SCHACHT, A. M.; CHARRIER, N.; DE CLERK, D. et al. Schistosomiasis coinfection in children influences acquired immune response against *Plasmodium falciparum* malaria antigens. **PLoS One**. 15(9): e12764, 2010.

DOOLAN, D. L.; HOFFMAN, S. L. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. **The journal of immunology.** 165(3): 1453-1462, 2000.

DOLD, C.; HOLLAND, C. V. **Ascaris and ascariasis.** *Microbes and Infection.* 13(7): 632-637, 2011a.

DOLD, C.; HOLLAND, C. V. Investigating the underlying mechanism of resistance to *Ascaris* infection. **Microbes Infect.** 13(7): 624-31, 2011b.

DONDORP, A. M.; ANGUS, B. J.; CHOTIVANICH, K.; SILAMUT, K.; RUANGVEERAYUTH, R.; HARDEMAN, M. R.; KAGER, P. A.; VREEKEN, J.; WHITE, N. J. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe *falciparum* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 60: 733-737, 1999.

DONDORP, A. M.; INCE C.; CHARUNWATTHANA, P.; HANSON, J.; VANKUIJEN, A.; FAIZ, M. A.; DAY, N. P. J. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe *falciparum* malaria. **Journal of Infectious Diseases.** 197(1): 79-84, 2008.

DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M.; BUFFET, P. A.; POESPOPRODJO, J. R.; YEO, T. W.; WHITE, N. J.; PRICE, R. N. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. **Malar. J.** 11: 135, 2012.

DOUMBO, S.; TRAN, T. M.; SANGALA, J. et al. Co-infection of long-term carriers of *Plasmodium falciparum* with *Schistosoma haematobium* enhances protection from febrile

malaria: a prospective cohort study in Mali. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 8(9): e3154, 2014.

DRAKE, L. J.; JUKES, M.C.H.; STERNBERG, R.J.; BUNDY, D.A.P. Geohelminth Infections (Ascariasis, Trichuriasis, and Hookworm): Cognitive and Developmental Impacts. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**. 1: 245–251, 2000.

DRUILHE, P.; KHUSMITH, S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria immune status. **Infect. Immun.** 55: 888-891, 1987.

DRUILHE, P.; TALL, A.; SOKHNA, C. Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria? **Trends Parasitol.** 21:359-362, 2005.

DURAI, P.; GOVINDARAJ, R.; CHOI, S. Structure and dynamic behavior of toll-like receptor 2 subfamily triggered by malarial glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. **FEBS J.** 280: 6196-6212, 2013.

DYER, M.; DAY, K. P. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Today**. 16:102-107, 2000.

EGAN, A. F.; MORRIS, J.; BARNISH, G.; ALLEN, S.; GREENWOOD, B. M.; KASLOW, D. C.; HOLDER, A. A.; RILEY, E. M. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. **J. Infect. Dis.** 173: 765-769, 1996.

EJIGIRI, I.; SINNIS, P. Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. **Curr. Opin. Microbiol.** 12(4): 401–407, 2009.

ENGWERDA, C. R.; BEATTIE, L.; AMANTE, F. H. The importance of the spleen in malaria. **Trends in Parasitology**. 21(2), 75–80, 2005.

EPIPHANIO, S.; CAMPOS, M. G.; PAMPLONA, A.; CARAPAU, D.; PENA, A. C.; ET AL. VEGF Promotes Malaria-Associated Acute Lung Injury in Mice. **PLoS Pathog.** 6(5): e1000916, 2010.

ERIKSEN, L. Host parasite relationships in *Ascaris suum* infection in pigs and mice. Thesis, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, 1981.

FAGERHOLM H. P.; NANSEN P, A.; FRANDBSEN, F.; ERIKSEN, L. Growth and structural features of the adult stage of *Ascaris suum* (Nematoda, Ascaridoidea) from experimentally infected domestic pigs. **J. Parasitol.** 84(2): 269-77, 1988.

FERREIRA, A.; MARGUTI, I.; BECHMANN, I.; VIKTÓRIA, J.; CHORA, A.; PALHA, N. R.; REBELO, S.; HENRI, A.; BEUZARD, Y.; SOARES, M. P. Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. **Cell.** 145, 398-409, 2011.

- FERNANDEZ-NIÑO, J. A.; IDROVO, A. J.; CUCUNUBÃ, Z. M. et al. Paradoxical associations between soil-transmitted helminths and *Plasmodium falciparum* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 106(11): 701–708, 2012.
- FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malar. J.** 15: 284, 2016.
- FERREIRA, C.S.; FERREIRA, U. M.; NOGUEIRA, M. R. Prevalência e intensidade de infecção por *Ascaris lumbricoides* em amostra populacional urbana. **Cad. de Saúde Pública.** 7:82-89, 1991.
- FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; MORRIS, S. C.; GILDEA, L.; STRAIT, R.; MADDEN, K. B.; SCHOPF, L.; URBAN, J. F. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunol. Rev.** 201:139-55, 2004.
- FINLAY, B. B.; MCFADDEN, G. Anti-Immunology: Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens. **Cell.** 124: 767–782, 2006.
- FLOREY, L. S.; KING, C. H.; VAN DYKE, M. K. et al., Partnering parasites: evidence of synergism between heavy *Schistosoma haematobium* and *Plasmodium* species infections in Kenyan children. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** 6(7): e1723, 2012.
- FLORENS, L.; WASHBURN, M. P.; RAINE, J. D.; ANTHONY, R. M.; GRAINGER, M.; HAYNES, J. D.; MOCH, J. K.; MUSTER, N.; SACCI, J. B.; TABB, D. L.; WITNEY, A. A.; WOLTERS, D.; WU, Y.; GARDNER, M. J.; HOLDER, A. A.; SINDEN, R. E.; YATES, J. R.; CARUCCI, D. J. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. **Nature.** 419: 520–526, 2002.
- FOLLER, M.; HUBER, S. M.; LANG, F. Erythrocyte programmed cell death. **IUBMB Life.** 60: 661-668, 2008.
- FONSECA, E. O.; TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; CARMO, E. H.; COSTA, M.A C. Prevalence and factors associated with geohelminth infections in children living in municipalities with low HDI in North and Northeast Brazil. **Cad. Saúde Pública.** 26(1): 143-52, 2010.
- FREVERT, U.; SINNIS, P.; CERAMI, C.; SHREFFLER, W.; TAKACS, B.; NUSSENZWEIG, V. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. **J. Exp. Med.** 177: 1287-1298, 1993.
- FRIIS, H.; EL KARIB, S. A.; SULAIMAN, S. M.; RAHAMA, A.; MAGNUSSEN, P.; MASCIE-TAYLOR, C. G. N. Does *Schistosoma haematobium* co-infection reduce the risk of malaria-induced splenomegaly? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 94(5): 535–536, 2000.

FUJIWARA, R. T.; GEIGER, S. M.; BETHONY J.; MENDEZ S. Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. **Parasite Immunology**. 28: 285–293, 2006.

GALVIN, T. J. Development of human and pig *Ascaris* in the pig and rabbit. **J. Parasitol.** 54: 1085–1091, 1968.

GALZERANO, A. et al. *Ascaris lumbricoides* infection: an unexpected cause of pancreatitis in a western Mediterranean country. **Eastern Mediterranean Health J.** 16(3): 350-1, 2010.

GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; NOGUEIRA, D. S.; OLIVEIRA, F. M. S.; BARBOSA, F. S.; AMORIM, C. C. O.; CARDOSO, M. S.; KRAEMER, L.; CALIARI, M. V.; AKAMATSU, M. A.; HO, P. L.; JONES, K. M.; WEATHERHEAD, J.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J.; ZHAN, B.; BARTHOLOMEU, D. C.; RUSSO, R. C.; BUENO, L. L.; FUJIWARA, R. T. IgG Induced by vaccination with *Ascaris suum* extracts is protective against infection. **Front. Immunol.** 9:2535, 2018.

GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C.; SILVA, F. N.; MATI, V. L.; DHOM-LEMOIS de C.; et al. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. **Int. J. Parasitol.** 43: 697-706, 2013.

GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H. et al. Concomitant helminth infection downmodulates the Vaccinia virus-specific immune response and potentiates virus-associated pathology. **Int J Parasit.** 47: 1- 10, 2017.

GAZZINELLI, R. T., ROPERT, C., CAMPOS, M. A. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. **Immunol. Rev.** 201:9-25, 2004.

GEIGER, S. M.; MASSARA, C. L.; BETHONY, J.; SOBOSLAY, P. T.; CARVALHO, O. S.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. **Parasite Immunol.** 24 (11-12): 499-509, 2002.

GEIGER, S. M.; CALDAS, I. R.; MC GLONE, B. E.; CAMPI-AZEVEDO, A. C.; DE OLIVEIRA, L. M.; BROOKER, S.; DIEMERT, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; BETHONY, J. M. Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. **Parasite Immunol.** 29(7): 347-58, 2007.

GEIGER, S. M. et al. *Necator americanus* and helminth co-infections: further down-modulation of hookworm-specific type 1 immune responses. **PLoS neglected tropical diseases.** 5(9): e1280, 2011.

- GENTON, B.; D'ACREMONT, V.; RARE, L.; BAEA, K.; REEDER, J. C.; ALPERS, M. P.; MULLER, I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Medicine**. 5:127, 2008.
- GEURTS, N.; MARTENS, E.; VERHENNE, S.; LAYS, N.; THIJS, G.; MAGEZ, S.; et al. Insufficiently defined genetic background confounds phenotypes in transgenic studies as exemplified by malaria infection in Tlr9 knockout mice. **PLoS ONE**. 6: e27131, 2011.
- GETIE, S.; WONDIMENEH, Y.; GETNET, G.; WORKINEH, M.; WORKU, L.; KASSU, A. et al. Prevalence and clinical correlates of *Schistosoma mansoni* co-infection among malaria infected patients, Northwest Ethiopia. **BMC research notes**. 8: 480, 2015.
- GLUSHAKOVA, S.; YIN, D.; LI, D.; ZIMMERBERG, J. Membrane Transformation during Malaria Parasite Release from Human Red Blood Cells. **Current Biology**. 15: 645- 1650, 2005.
- 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 vaccine research. **Annu. Rev. Immunol**. 2005.
- GOONEWARDENE, R.; CARTER, R.; GAMAGE, P.; DEL GUIDICE, G.; DAVID, P.H.; HOWIE, S.; MENDIS, K.N. Human T-cell proliferative responses to *P. vivax* antigens: evidence of immunosuppression following prolonged exposure to endemic malaria. **Eur. J. Immunol**. 20:1387, 1990.
- GRAU, G. E.; KOSSODO, S. Cerebral malaria: Mediators, mechanical obstruction or more? **Parasitol Today**. 10: 408-409, 1994.
- GRAU, G. E.; PIGUET, P. F.; ENGERS, H. D.; LOUIS, J. A.; VASSALI, P.; LAMBERT, P. H. L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. **J Immunol**. 137: 2348-2354, 1986.
- GRAU, G. E.; TACCHINI-COTTIER, F.; VESIN, C.; MILON, G.; LOU, J. N.; PIGUET, P. F.; JUILLARD, P. **Eur. Cytokine Network**. 4, 415–419, 1993.
- GREEN, N. M. Protease Inhibitors from *Ascaris lumbricoides*. **Biochemical J**. 16: 416-9, 1957.
- GREEN, T. J.; KREIER, J. P. Demonstration of the role of cytophilic antibody in resistance to malaria parasites (*Plasmodium berghei*) in rats. **Infection and immunity**. 19 (1): 138-145, 1978.
- GREENWOOD, B. M.; PALIT, A.; BRADLEY-MOORE, A.; BRYCESON, A. D. M. Immunosuppression in children with malaria. **Lancet**. 1: 169-172, 1972.

- GRIFFITHS, E. C.; FAIRLIE-CLARKE, K.; ALLEN, J. E.; METCALF, C. J. E.; GRAHAM, A. L. Bottom-up regulation of malaria population dynamics in mice co-infected with lungmigratory nematodes. **Ecol. Lett.** 18, 1387 – 1396, 2015.
- GUABIRABA, R.; RUSSO, R. C.; COELHO, A. M.; FERREIRA, M. A.; LOPES, G. A.; GOMES, A. K.; et al. Blockade of cannabinoid receptors reduces inflammation, leukocyte accumulation and neovascularization in a model of sponge-induced inflammatory angiogenesis. **Inflamm. Res.** 62(8): 811–21, 2013.
- GUPTA, G., OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. **Advances in applied microbiology.** 82: 155-84, 2013.
- GUPTA, S.; DAY, K. P. A strain theory of malaria transmission. **Parasitology Today.** 10(12): 476 – 48, 1994.
- GYAN, B.; KURTZHALS, J. A. L.; AKANMORI, B. D.; OFORI, M.; GOKA, B. Q.; HVIID, L.; BEHR, C. Elevated levels of nitric oxid and low levels of haptoglobin are associated with severe malarial anaemia in african children. **Acta Tropica.** 83: 133-140, 2002.
- HAILU, T.; YIMER, M.; MULU, W.; ABERA, B. Synergetic Effects of Plasmodium, Hookworm, and *Schistosoma mansoni* Infections on Hemoglobin Level among Febrile School Age Children in Jawe Worda, Northwest Ethiopia. **Journal of Parasitology Research.** 9573413, 6, 2018.
- HAQUE, A.; BEST, S. E.; AMANTE, F. H.; AMMERDORFFER, A.; DE LABASTIDA, F.; PEREIRA, T.; RAMM, G. A.; ENGWERDA, C. R. High parasite burdens cause liver damage in mice following *Plasmodium berghei* ANKA infection independently of CD8(+) T cell-mediated immune pathology. **Infect. Immun.** 79, 1882–1888, 2011.
- HANSEN, D. S.; SCHOFIELD, L. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? **PLoS Pathog.** 6: e1000771, 2010.
- HANS, D.; PATTNAIK, P.; BHATTACHARYYA, A.; SHAKRI, A. R.; YAZDANI, S. S.; SHARMA, M.; CHOE, H.; FARZAN, M.; CHITNIS, C. E. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* 116 domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. **Molecular Microbiology.** 55: 1423-1434, 2005.
- HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; WEAVER, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Curr. Opin. Immunol.** 18(3):349–56, 2006.
- HARTGERS, F. C. et al. Responses to malarial antigens are altered in helminth infected children. **J. Infect. Dis.** 199: 1528–35, 2009.
- HARTGERS, F. C.; YAZDANBAKSH, M. Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. **Parasite Immunology.** 28: 497–506, 2006.

HASNAIN, S. Z.; EVANS, C. M.; ROY, M.; GALLAGHER, A. L.; KINDRACHUK, K. N.; BARRON, L.; DICKEY, B. F.; WILSON, M. S.; WYNN, T. A.; GRENCIS, R. K.; THORNTON, D. J. Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. **J. Exp. Med.** 208(5): 893-900, 2011.

HEDRICK, P. W. Population genetics of malaria resistance in humans. **Heredity.** 107(4), 283-304, 2011.

HELMBY, H.; JONSSON, G.; TROYE-BLOMBERG, M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi* chabaudi AS. **Infect Immun.** 68:1485–90, 2000.

HERRERA, I. A.; MENESES, L. T. Síndrome de Loeffler: Presentación de un caso. **Cuadernos del Hospital de Clinicas.** 50(2): 69-73, 2005.

HEWITSON, J. P.; GRAINGER, J. R.; MAIZELS, R. M. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. **Mol. Biochem. Parasitol.** 167: 1–11, 2009.

HEY, J. Parasite populations: the puzzle of Plasmodium. **Curr. Biol.** 9(15): 565-567, 1999.

HILL, D. L.; ERIKSSON, E. M.; SUEN, C. S. L. W.; CHIU C. Y.; RYG-CORNEJO, V.; ROBINSON, L. J.; SIBA, P.M.; MUELLER, I.; HANSEN, D.S.; SCHOFIELD, L. Oponising Antibodies to *P. falciparum* Merozoites Associated with Immunity to Clinical Malaria. *PloS one.* 8(9), e74627, 2013.

HILLIER, S. D.; BOOTH, M.; MUHANGI, L. et al. *Plasmodium falciparum* and helminth coinfection in a semiurban population of pregnant women in Uganda. **Journal of Infectious Diseases.** 198(6): 920–927, 2008.

HIRAKAWA, E.; SUETSUGU, T.; TANOUE, A.; TAKAGI, K.; SHINMURA, M.; MACHIDA, K.; FUKUOKA, T.; NIINA, K. Pulmonary eosinophilia caused by visceral larva due to *Ascaris suum*. **Nihon Naika Gakkai Zasshi.** 98(1): 144-146, 2009.

HOENIGL, M.; VALENTIN, T.; ZOLLNER-SCHWETZ, I.; SALZER, H. J.; RAGGAM, R. B.; STRENGER, V.; FLICK, H.; WURM, R.; KRAUSE, R. Pulmonary ascariasis: two cases in Austria and review of the literature. **Wien Klin Wochenschr.** 122(3): 94-6, 2010.

HOFFMAN, S. L.; ISENBARGER, D.; LONG, G. W.; SEDEGA, H M.; SZARFMAN, A.; WATERS, L.; BALLOU, W. R. Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. **Science.** 244(4908): 1078-1081, 1989.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The Sedimentation-Concentration Method in *Schistosomiasis mansoni*. **Puerto Rico Journal of Public Health.** 9: 281-98, 1934.

HOGH, B.; MARBIAH, N. T.; BURGHAUS, P. A.; ANDERSEN, P. K. Relationship between maternally derived anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and risk of infection and

disease in infants living in an area of Liberia, west Africa, in which malaria is highly endemic. **Infect Immun.** 63: 4034-4038, 1995.

HOLLAND, C. V.; BEHNKE, J. M.; DOLD, C. **Larval Ascariasis: Impact, Significance, and Model Organisms.** In: *Ascaris the neglected parasite.* Ed. Elsevier. Amsterdam. c. 5, p. 107-125, 2013.

HORNE-DEBETS, J. M.; FALEIRO, R.; KARUNARATHNE, D. S.; LIU, X. Q.; LINEBURG, K. E.; POH, C. M.; et al. PD-1 dependent exhaustion of CD8 T cells drives chronic malaria. **Cell Rep.** 5:1204–13, 2013.

HORUK, R.; CHITNIS, C. E.; DARBONNE, W. C.; COLBY, T. J.; RYBICKI, A.; HADLEY, T. J.; MILLER, L. H. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. **Science.** 261: 1182–1184, 1993.

HOTCHKISS, R. S.; COOPERSMITH, C. M.; MCDUNN, J. E.; FERGUSON, T. A. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. **Nat. Med.** 15: 496–497, 2009.

HOTEZ, P. Enlarging the “Audacious Goal”: elimination of the world’s high prevalence neglected tropical diseases. **Vaccine.** 29 Suppl 4, D104–10, 2011.

HOTEZ, P. J.; KAMATH A. Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 3: 412, 2009.

HOTEZ, P. J.; BRINDLEY, P. J.; BETHONY, J. M.; KING, C. H.; PEARCE, E. J.; JACOBSON, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. **J. Clin. Invest.** 118(4): 1311-21, 2008.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich Sachs S, Sachs JD 2006. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS Med.** 3:102, 2006.

HOTEZ, P. J.; BASANEZ, A, M.; BOLLIGER, M. G.; BOURNE, I.; R. et al. The Global Burden of Disease Study 2010: implications for the neglected tropical diseases. **PLOS Negl Trop Dis.** In Press, 2014.

IDRO, R.; JENKINS, N. E.; NEWTON, C. R. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. **The Lancet Neurology.** 4(12): 827–840, 2005.

ILLINGWORTH, J.; BUTLER, N. S.; ROETYNCK, S.; MWACHARO, J.; PIERCE, S. K.; BEJON, P.; et al. Chronic exposure to *Plasmodium falciparum* is associated with phenotypic evidence of B and T Cell exhaustion. **J. Immunol.** 190(3):1038–47, 2013.

- JACOBS, P.; RADZIOCH, D.; STEVENSON, M. M. A Th1-Associated Increase in Tumor Necrosis Factor Alpha Expression in the Spleen Correlates with Resistance to Blood-Stage Malaria in Mice. **Infection and immunity**. p. 535–541, 1996.
- JACKSON, J. A.; TURNER, J. D.; RENTOUL, L. et al. T helper cell type 2 responsiveness predicts future susceptibility to gastrointestinal nematodes in humans. **J. Infect. Dis.** 190: 1804–1811, 2004.
- JARDIM-BOTELHO, A. et al. Intestinal helminths and cognitive performance in Brazil. **Tropical Medicine and International Health**. 13(8): 994-1004, 2008.
- JENKINS, M. O.; BEACH, M. W. Intestinal obstruction due to áscaris. Report of thirty-one cases. **Pediatrics**. 13: 410-425, 1954.
- JEX, A. R.; LIU, S.; LI, B.; YOUNG, N. D.; HALL, R. S.; et al. *Ascaris suum* draft genome. **Nature**. 479: 529–533, 2011.
- JOSLING, G. A.; LLINÁS, M. Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. **Nature Reviews Microbiology**. 13(9): 573–587, 2015.
- KALANTARI, P.; DE OLIVEIRA, B.; CHAN, J.; CORBETT, Y.; RATHINAM, A. S.; LATZ, E.; GAZZINELLI, R. T.; GOLENBOCK, D. T.; FITZGERALD, K. A. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. **Cell Reports**. 6: 196-210, 2014.
- KARUNARATHNE, D. S.; HORNE-DEBETS, J. M.; HUANG, J. X.; FALEIRO, R.; LEOW, C. Y.; AMANTE, F. H.; et al. Programmed death-1 ligand 2-mediated regulation of the PD-L1 to PD-1 axis is essential for establishing CD4+ T cell immunity. **Immunity**. 45:333–45, 2016.
- KENNEDY, M. W. **Ascariasis**. In: Encyclopedia of Immunology. p. 226765, 1998.
- KHUROO, M. S. Ascariasis. **Gastroenterol Clin. North Am.** 25(3): 553-77, 1996.
- KILLICK-KENDRICK, R. **Taxonomy, Zoography and Evolution**. In: Rodent Malaria (R. Killick-Kendrick and W. Peters, eds.) pp 1-52. Academic Press, London, 1978.
- KITA, H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. **Immunol. Rev.** 242(1): 161-77, 2011.
- KNELL, A. J.(ed). **Malaria**. Oxford University press, Oxford. 1991.
- KOCHAR, D. K.; DAS A.; KOCHAR, S. K.; SAXENA, V.; SIROCHI, P. KOCHAR, A. KHATRI, M. P.; GUPTA, V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in Northwestern India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 80: 194-198, 2009.

- KOOPMANS, L. C.; VAN WOLFSWINKEL, M. E.; HESSELINK, D. A.; HOORN, E. J.; KOELEWIJN, R.; VAN HELLEMOND, J. J. et al. Acute kidney injury in imported *Plasmodium falciparum* malaria. **Malar. J.** 14: 523, 2015.
- KOSSODO, S. & GRAU, G. E. Profiles of cytokines production in relation with susceptibility to cerebral malaria. **J. Immunol.** 151: 4811-4820, 1993.
- KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malaria relapse. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 79: 1-11, 1985.
- KUMAR, D.; SHARMA, C. B. A comparative study of serum Alt & Ast level and Ast/Alt ratio in alcoholic and non-alcoholic acute uncomplicated falciparum malaria without clinical jaundice. **J. Dental Med. Sci.** 16: 6–8, 2017.
- LACERDA, M. V. G; MOURÃO, M. P. G.; ALEXANDRE, M. A. A.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. M. L.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malar. J.** 11:12, 2012.
- LACERDA, M. V. G.; MOURÃO, M. P. G.; COELHO, H. C. C.; SANTOS, J. B. Thrombocytopenia in malaria: who cares? **Men. Inst. Oswaldo Cruz.** 106: 52-63.
- LACERDA-QUEIROZ, N.; LIMA, O. C.; CARNEIRO, C. M.; VILELA, M. C.; TEIXEIRA, A. L.; et al. Plasmodium berghei NK65 induces cerebral leukocyte recruitment in vivo: an intravital microscopic study. **Acta Tropica.** 120: 31–39, 2011.
- LAGASSÉ, H. A. D.; ANIDI, I. U.; CRAIG, J. M., et al. Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. **J. Leukoc. Biol.** 99: 659-671, 2016
- LAMB, T. J.; BROWN, D. E.; POTOČNIK, A. J.; LANGHORNE, J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert Rev. Mol. Med.** 8(6): 1-22, 2006.
- LAMBERTON, P. H.; JOURDAN, P. M. Human Ascariasis: Diagnostics Update. **Curr. Trop. Med. Rep.** 4(2): 189-200, 2015.
- LAMIKANRA, A. A.; THERON, M.; KOOIJ, T. W.; ROBERTS, D. J. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. **PLoS One.** 4: 8446, 2009.
- LANÇA, E. F.; MAGALHÃES, B. M.; VITOR-SILVA, S.; SIQUEIRA, A. M.; BENZECRY, S. G.; ALEXANDRE, M. A.; O'BRIEN, C.; BASSAT, Q.; LACERDA, M. V. Risk factors and characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to pediatric intensive care units in the Brazilian Amazon. **PLoS One.** 7: 35406, 2012.

- LANGHORNE, J.; NDUNGU, F. M.; SPONAAS, A. M.; MARSH, K. Immunity to malaria: More questions than answers. **Nat. Immunol.** 9:725–732, 2008.
- LE HESRAN, J. K.; AKIANA, J.; EL NIDIAYE, H. M.; DIA, M.; SENGHOR, P. ET AL. Severe malaria attack is associated with high prevalence of *Ascaris lumbricoides* infection among children in rural Senegal. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 98: 397–399, 2004.
- LELES, D. et al. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **Parasit Vectors.** 5: 42, 2012.
- LELES, D. et al. Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Columbian South America times. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 103(1): 106-8, 2008.
- LEMAITRE, M.; WATIER, L.; BRIAND, V.; GARCIA, A.; LE HESRAN, J. Y.; COT, M. Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: additional evidence of the protective effect of schistosomiasis on malaria in Senegalese children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 90(2): 329–334, 2014.
- LEWIS, R.; BEHNKE, J. M.; STAFFORD, P.; HOLLAND, C. V. The development of a mouse model to explore resistance and susceptibility to early *Ascaris suum* infection. **Parasitology.** 132: 289-300, 2006.
- LEWIS, R.; BEHNKE, J. M.; CASSIDY, J. P.; STAFFORD, P.; MURRAY, N.; HOLLAND C. The migration of *Ascaris suum* larvae, and the associated pulmonary inflammatory response in susceptible C57BL/6j and resistant CBA/Ca mice. **Parasitology.** 134: 1301–1314, 2007.
- LIBREGTS, S. F.; GUTIÉRREZ, L.; BRUIN, A. M.; WENSVEEN, F. M.; PAPADOPOULOS, P.; IJCKEN, W.; OZGUR, Z.; PHILIPSEN, S.; NOLTE, M. A. Chronic IFN- γ production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. **Blood.** 118: 2578-2588, 2011.
- LIU, G. H.; WU, C. Y.; SONG, H. Q.; WEI, S. J.; XU, M. J.; LIN, R. Q.; ZHAO, G. H.; HUANG, S. Y.; ZHU, X. Q. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. **Gene.** 492:110–116, 2012.
- LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C. J. M.; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Pan American Journal of Public Health.** 11(4), 2002.
- LOPES, L. N.; FOLHA SANTOS, F. A.; MARQUES OLIVEIRA, L. C.; FERREIRA ARAUJO, M. T.; SEQUEIRA, C. G.; LIBONATI, R. M. et al. An analysis of the influence of sex hormones on Balb/c mice infected with *Plasmodium berghei*. **Microbial pathogenesis.** 90: 7-12, 2016.

LOUW, J. H. Abdominal complications of *Ascaris lumbricoides* infestation in children. **Brit. J. Surg.** 53 (6): 510-22, 1966.

LOVEGROVE, F. E.; GHARIB, S. A.; PEÑA-CASTILLO, L.; PATEL, S. N.; RUZINSKI, J. T.; HUGHES, T. R.; KAIN, K. C. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. **PLoS pathogens.** 4(5), 2008.

LUH, S.; CHIANG, C. Acute injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J Zhejiang Univ Sci B.* 8(1): 60-9, 2007.

LUSTIGMAN, S. et al. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 6, e1582, 2012.

LYKE, K. E.; DICKO, A.; DABO, A. et al., Association of *Schistosoma haematobium* infection with protection against acute *Plasmodium falciparum* malaria in Malian children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 73(6): 1124–1130, 2005.

MACKINNON, M.J.; MWANGI, T.W.; SNOW, R.W.; MARSH, K.; WILLIAMS, T.N. Heritability of Malaria in Africa. **PLoS Medicine.** 2(12): e340, 2005.

MAIZELS, R. M.; BALIC, A. Resistance to helminth infection: the case for interleukin-5-dependent mechanisms. **J. Infect. Dis.** 190: 427–429, 2004.

MAIZELS, R. L.; BUNDY, D. A.; SELKIRK, M. E.; SMITH, D. F.; ANDERSON, R. M. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. **Nature.** 365: 797-805, 1993.

MAIZELS, R. M.; HEWITSON, J. P.; SMITH, K. A. Susceptibility and immunity to helminth parasites. **Curr. Opin. Immunol.** 24: 459-66, 2012.

MAGALHÃES, B. M. L.; ALEXANDRE, M. A. A.; SIQUEIRA, A. M.; MELO, G. C.; GIMAQUE, J. B. L. BASTOS, M. S. et al. Clinical profile of concurrent dengue fever and *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: case series of 11 hospitalized patients. **Am J Trop Med Hyg.** 87(6): 1119-24, 2012.

MAGALHÃES, K. et al. Schistosomal derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll like receptor-2-dependent mechanisms. **J Infect. Dis.** 202(9): 1369-79, 2010.

MALAGUARNERA, L.; MUSUMECI, S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. **Lancet Infect. Dis.** 2: 472-478, 2002.

MANTEL, P. MARTI, M. The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasite. **Cell Microbiol.** 16: 344-354, 2014.

- MANTOVANI, A.; DEJANA, E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. **Immunology Today**. 10: 370-375, 1989.
- MARTIN, J. et al. The prevalence and intensity of *Ascaris lumbricoides* infections in Moslem children from northern Bangladesh. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 77(5): 702-6, 1983.
- MARTINI, F.; PAGLIA, M. G.; MONTESANO, C.; ENDERS, P. J.; GENTILE, M.; PAUZA, C. D.; et al. Vgamma9Vdelta2 T-cell anergy and complementarity-determining region 3-specific depletion during paroxysm of nonendemic malaria infection. **Infect. Immun.** 71: 2945-9, 2003.
- MATSUMOTO, J.; KAWAI, S.; TERAOKA, K.; KIRINOKI, M.; YASUTOMI, Y.; AIKAWA, M.; et al. Malaria infection induces rapid elevation of the soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of Macaca monkeys to *Plasmodium coatneyi* infection. **Infect. Immun.** 68:1183-8, 2000.
- MATTHAY, M. A.; ZEMANS, R. L. The Acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. **Annu. Rev. Pathol.** 6: 147-163, 2011.
- MAYXAY, M.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; NEWTON, P. N.; WHITE, N. J. Mixed-species malaria infections in humans. **Trends in parasitology**. 20 (5): 233-240, 2004.
- MAZIGO, H. D.; KIDENYA, B. R.; AMBROSE, E.; ZINGA, M.; WAIHENYA, R. Association of intestinal helminths and *Plasmodium falciparum* infections in co-infected school children in north-west Tanzania. **Tanzania Journal of Health Research**. 12(4), 2010.
- MAZIGO, H. D.; KIDENYA, B. R.; AMBROSE, E. E.; ZINGA, M.; WAIHENYA, R. Association of intestinal helminths and *P. falciparum* infections in co-infected school children in northwest Tanzania. **Tanzania Journal of Health Research**. 12(4): 299-301, 2010.
- MCKERROW, J. H., CAFFREY, C., KELLY, B., LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in parasitic diseases. **Annu. Rev. Pathol.** 1, 497-536, 2006.
- MEDANA, I. M.; HUNT, N. H.; CHAN-LING, T. Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria. **Glia**. 19(2): 91-103, 1997.
- MELO, G. C.; REYES-LECCA, R. C.; VITOR-SILVA, S. et al. Concurrent helminthic infection protects schoolchildren with *Plasmodium vivax* from anemia. **PLoS one**. 5(6): e11206, 2010.
- MENDEZ, S.; ZHAN, B.; GOUD, G.; GHOSH, K.; DOBARDZIC, A.; WU, W. H.; LIU, S.; DEUMIC, V.; DOBARDZIC, R.; LIU, Y. Y., et al. Effect of combining the larval antigens ancylostomasecreted protein 2 (ASP-2) and metalloprotease 1 (MTP-1) in protecting

hamsters against hookworm infection and disease caused by *Ancylostoma ceylanicum*. **Vaccine**. 2005.

MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 64: 97-106, 2001.

MIDZI, N.; SANGWEME, D.; ZINYOWERA, S. et al., “The burden of polyparasitism among primary schoolchildren in rural and farming areas in Zimbabwe. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 102(10): 1039–1045, 2008.

MILLER, L. A. et al. Ascariasis in humans and pigs on small-scale farms, Maine, USA, 2010–2013. **Emerging Infect. Dis.** 21(2): 332-4, 2015.

MILLER, L. H.; ACKERMAN, H. C.; SU, X. Z.; WELLEMS, T. E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**. 19, 156-168, 2013.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**. 415(6872): 673-679, 2002.

MILLHOLLAND, M. G.; CHANDRAMOHANADAS, R.; PIZZARRO, A.; WEHR, A.; SHI, H.; DARLING, C.; LIM, C. T.; GREENBAUM, D. C. The malaria parasite progressively dismantles the host erythrocyte cytoskeleton for efficient egress. **Molecular & Cellular Proteomics**. 10: 111.010678, 2011.

MIN-OO, G.; GROS, P. Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect. **Cellular microbiology**. 7(6): 753-763, 2005.

MITCHELL, G. H.; THOMAS, A. W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A. R.; BANNISTER, L. H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. **Infection and Immunity**. 72: 154-158, 2004.

MOHAN, A.; SHARMA, S. K.; BOLLINENI, S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**. 45 (3): 179–193, 2008.

MOLLER, M. et al. Genetic haplotypes of Th-2 immune signalling link allergy to enhanced protection to parasitic worms. **Human Molecular Genetics**. 16(15): 1828-36, 2007.

MOLYNEUX, D. H.; HOTEZ, P. J.; FENWICK, A. “Rapid-impact interventions”: how a policy of integrated control for Africa’s neglected tropical diseases could benefit the poor. **PLoS Medicine**. 2: e336, 2005.

MOODY, A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. **Clinical Microbiology Reviews**. 66–78, 2002.

MORANO, J.; MORANO, J. F. B.. Ascariidose vesicular. **RECCS**. p. 12-3, 1988.

- MORIYASU, T.; NAKAMURA, R.; DELOER, S.; SENBA, M.; KUBO, M.; et al. *Schistosoma mansoni* infection suppresses the growth of *Plasmodium yoelii* parasites in the liver and reduces gametocyte infectivity to mosquitoes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 12(1): e0006197, 2018.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.** 8(12): 958-69, 2008.
- MOUATCHO, J. C.; GOLDRING, J. P. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. **J. Med. Microbiol.** 62:1491–1505, 2013.
- MUELLER, A. K.; BEHRENDTS, J.; HAGENS, K.; MAHLO, J.; SCHAIBLE, U. E.; SCHNEIDER, B. E. Natural transmission of *Plasmodium berghei* exacerbates chronic tuberculosis in an experimental co-infection model. **PLoS One**. 7(10): e48110, 2012.
- MUELLER I, GALINSKI MR, BAIRD JK, CARLTON JM, KOCHAR DK, ALONSO PL, DEL PORTILLO HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**. 9: 555-566, 2009.
- MUELLER, I. GALINSKI, M. R.; TSUBOI, T.; AREVALO-HERRERA, M.; COLLINS, W. E.; KING, C. L. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. **Adv. Parasitol.** 81: 77–131, 2013.
- MUELLER, A. K.; KOHLHEPP, F.; HAMMERSCHMIDT, C.; MICHEL, K. Invasion of mosquito salivary glands by malaria parasites: prerequisites and defense strategies. **Int. J. Parasitol.** 40: 1229–1235, 2010.
- MULU, A. KASSU, A.; LEGESSE, M.; ERKO, B.; NIGUSSIE, D.; SHIMELIS, T.; BELYHUN, Y.; MOGES, B.; OTA, F.; ELIAS, D. Epidemiological and clinical correlates of malaria–helminth co-infections in southern Ethiopia. **Malar. J.** 12: 227, 2013.
- MURPHY, S. C. ; BREMAN, J. G. Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 64: 57-67, 2001.
- MURRAY, C. K.; GASSER, R. A. J.; MAGILL, A. J. et al. Update on rapid diagnostic testing for malaria. **Clin. Microbiol. Rev.** 21:97–11, 2008.
- MURRAY, M. J.; MURRAY, A. B.; MURRAY, M. B.; MURRAY, C. J. Parotid enlargement, forehead edema, and suppression of malaria as nutritional consequences of ascariasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 30(12): 2117–2121, 1977.
- MURRAY, M. J.; MURRAY, A. B.; MURRAY, M. B.; MURRAY, C. J. The biological suppression of malaria: an ecological and nutritional interrelationship of a host and two parasites. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 31(8): 1363–1366, 1978.

- MURRAY, K. A.; PRESTON, N.; ALLEN, T.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.; HOSSEINI, P. R.; DASZAK, P. Global biogeography of human infectious diseases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 112(41): 12746–51, 2015.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat. Rev. Immunol.** 11(11): 723-37, 2011.
- MURRELL, K. D.; ERIKSEN, L.; NANSEN, P.; SLOTVED, H. C.; RASMUSSEN, T. *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. **J. Parasitol.** 83: 255-260, 1997.
- MUTAPI, F.; ROUSSILHON, C.; MDULUZA, T.; DRUILLE, P. Anti-malaria humoral responses in children exposed to *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 102(3): 405-9, 2007.
- MWANGI, T. W.; BETHONY, J.; BROOKER, S. Malaria and helminth interactions in humans: an epidemiological viewpoint. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 100(7): 551-70, 2006.
- MWENDA, A. S.; ILKUL, J. H. Obstructive ileal ascariasis. **New Engl. J. Med.** 368(10): 943, 2013.
- NACER, A.; MOVILA, A.; BAER, K.; MIKOLAJCZAK, S. A.; KAPPE, S. H.; et al. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. **PLoS Pathog.** 8: e1002982, 2012.
- NACHER, M. Interactions between worms and malaria: good worms or bad worms? **Malar. J.** 10, 259. 2011.
- NACHER, M.; GAY, F.; SINGHASIVANON, P.; KRUDSOOD, S.; TREEPRASERTSUK, S.; MAZIER, D.; VOULDOUKIS, I.; LOOAREESUWAN S. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. **Parasite Immunol.** 22: 107-113, 2000.
- NACHER, M.; GAY, F.; SINGHASIVANON, P.; KRUDSOOD, S. et al. Inverse relationship between the number of fertilized *Ascaris* eggs excreted and fever, in patients co-infected with *Plasmodium vivax* and *Ascaris lumbricoides*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology.** 99(6): 623–625, 2005.
- NACHER, M.; SINGHASIVANON, P.; GAY, F.; PHUMRATANAPRAPIN, W.; SILACHAMROON, U.; LOOAREESUWAN, S. Association of helminth infection with decreased reticulocyte counts and hemoglobin concentration in Thai falciparum malaria. **The Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65(4): 335–337, 2001a.
- NACHER, M.; SINGHASIVANON, P.; TRAORE, B.; VANNAPHAN, S.; GAY, F.; CHINDANOND, D.; FRANETICH, J. F.; MAZIER, D.; LOOAREESUWAN, S. Helminth infections are associated with protection from cerebral malaria and increased nitrogen derivatives concentrations in Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 66: 304 –309, 2002a.

- NACHER, M.; SINGHASIVANON, P.; SILACHAMROON, U. et al. Helminth infections are associated with protection from malaria-related acute renal failure and jaundice in Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65(6): 834–836, 2001b.
- NACHER, M.; SINGHASIVANON, P.; YIMSAMRAN, S.; MANIBUNYONG, W.; THANYAVANICH, N.; WUTHISEN, P.; LOOAREESUWAN, S. Intestinal Helminth Infections Are Associated with Increased Incidence of *Plasmodium falciparum* Malaria in Thailand. **The Journal of Parasitology.** 88(1): 55, 2002b.
- NAING, C.; WHITTAKER, M. A.; NYUNT-WAI, V.; REID, S. A.; WONG, S. F.; MAK, J. W. et al. Malaria and soil-transmitted intestinal helminth co-infection and its effect on anemia: a meta-analysis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 107: 672–683, 2013.
- NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell.** 140(6): 871-82, 2010.
- NAUS, C. W.; JONES, F. M.; SATTI, M. Z.; JOSEPH, S.; RILEY, E. M. KIMANI, G. et al. Serological responses among individuals in areas where both schistosomiasis and malaria are endemic: cross-reactivity between *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium falciparum*. **J. Infect. Dis.** 15(187): 1272-82, 2003.
- NEILL, A. L.; HUNT, N. H. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. **Parasitology.** 105: 165-175, 1992.
- NEJSUM, P.; BETSON, M.; BENDALL, R. P.; THAMSBORG, S. M.; STOTHARD, J. R. Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. **J. Helminthol.** 2 (86): 148-55, 2012.
- NEWBOLD, C.; CRAIG, A.; KYES, S.; ROWE, A.; FERNANDEZ-REYES, D.; FAGAN, T. Cytoadherence, Pathogenesis and Red cell surface in *Plasmodium falciparum*. **Int. J. Parasitol.** 29: 927-937, 1999.
- NILSSON, S. K.; CHILDS, L. M.; BUCKEE, C.; MARTI, M. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. **PLoS Pathog.** 11(6): e1004871, 2015.
- NOGUEIRA, D. S.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; BARBOSA, F. S.; RESENDE, N. M.; SILVA, C. C.; DE OLIVEIRA, L. M.; AMORIM, C. C.; OLIVEIRA, F. M.; MATTOS, M. S.; KRAEMER, L. R.; CALIARI, M. V.; GAZE, S.; BUENO, L. L.; RUSSO, R. C.; FUJIWARA, R. T. Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. **PLoS Negl Trop Dis.** 10 (1), 2016.
- OH, C. S. et al. Paleoparasitological report on *Ascaris* aDNA from an ancient East Asian sample. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 105(2): 225-8, 2010.
- OJHA, S. C.; JAIDE, C.; JINAWATH, N.; ROTJANAPAN, P.; BARAL, P. Geohelminths: public health significance. **J. Infect. Dev. Ctries.** 8(1): 5-16, 2014.

OLLIARO, P. L.; BARNWELL, J. W.; BARRY, A.; MENDIS, K.; MUELLER, I.; REEDER, J. C. et al. Implications of *Plasmodium vivax* biology for control, elimination, and research. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 95 (Suppl 6): 4–14, 2016.

OKSANEN, A.; ERIKSEN, L.; ROEPSTORFF, A.; ILSØE, B.; NANSEN, P.; LIND, P. Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs. A comparison of eggs collected from worm uteri with eggs isolated from pig faeces. **Acta Vet. Scand.** 31: 393–398, 1990.

ORENGO, J. M.; EVANS, J. E.; BETTIOL, E.; LELIWA-SYTEK, A.; DAY, K.; RODRIGUEZ, A. Plasmodium-induced inflammation by uric acid. **PLoS Pathog.** 4, e1000013, 2008.

OSAKUNOR, D. N. M.; SENGEH, D. M.; MUTAPI, F. Coinfections and comorbidities in African health systems: At the interface of infectious and noninfectious diseases. **PLoS Negl Trop Dis.** 12(9): e0006711, 2018.

O'SHIRO, T. O. et al. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. **Immunol. Cell Biol.** 84:138-44, 2006.

PALMER, D. R.; HALL, A.; HAQUE, R.; ANWAR, K. S. Antibody isotype responses to antigens of *Ascaris lumbricoides* in a case-control study of persistently heavily infected Bangladeshi children. **Parasitology.** 111: 385–93, 1995.

PARROCHE, P.; LAUW, F. N.; GOUTAGNY, N.; LATZ, E.; MONKS, B.G.; VISINTIN, A.; HALMEN, K.A.; LAMPHIER, M.; OLIVIER, M.; BARTHOLOMEU, D.C. et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 104:1919-1924, 2007.

PATERSON, J. C. M. et al. Modulation of a heterologous immune response by the products of *Ascaris suum*. **Infec Immun.** 70 (11): 6058-67, 2002.

PATTANAPANYASAT, K.; SRATONGNO, P.; CHIMMA, P.; CHITJAMNONGCHAI, S.; POLSRILA, K.; CHOTIVANICH, K. Febrile temperature but not proinflammatory cytokines 124 promotes phosphatidylserine expression on *Plasmodium falciparum* malaria-infected red blood cells during parasite maturation. **Cytometry Part. A.** 77: 515-523, 2010.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.** 2(7): 499–511, 2002.

PÉRIGNON, J. L.; DRUILHE, P. Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 89: 51-53, 1994.

PERRIGOUE, J. G.; MARSHALL, F. A.; ARTIS, D. On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites. **Cell Microbiol.** 10(9):

1757-64. 2008.

PHAM, T. T.; VERHEIJEN, M.; VANDERMOSTEN, L.; DEROOST, K.; KNOOPS, S.; et al. Pathogenic CD8+ T Cells Cause Increased Levels of VEGF-A in Experimental Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome, but Therapeutic VEGFR Inhibition Is Not Effective. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 7:416. 2017.

PHILLIPS, M. A.; BURROWS, J. N.; MANYANDO, C.; VAN HUIJSDUIJNEN R. H.; VAN VOORHIS, W. C.; WELLS, T. N. C. Malaria. **Nat. Rev. Dis. Primers.** 3: 17050, 2017.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nat Med.** 17: 1381–1390, 2011.

PINEDA, M. R. B.; RAMOS, J. D. A. *Ascaris suum* infective eggs up regulate IL-4, 5 and 10 in BALB/c mice. **Philippine Sci Let.** 5(2): 139-49, 2012.

PINZON-CHARRY, A.; WOODBERRY, T.; KIENZLE, V.; MCPHUN, V.; MINIGO, G.; LAMPAH, D. A.; et al. Apoptosis and dysfunction of blood dendritic cells in patients with falciparum and vivax malaria. **J. Exp. Med.** 210:1635–46, 2013.

PLEBANSKI, M.; HILL A. V. S. The immunology of malaria infection. **Curr. Opin. Immunol.** 12: 437-441, 2000.

PRICE, R. N.; TJITRA, E.; GUERRA, C. A.; YEUNG, S.; WHITE, N. J.; et al. Vivax malaria: neglected and not benign. **Am J Trop Med Hyg.** 77: 79–87, 2007.

PULLAN, R. L.; BIKIRWA, H.; STAEDKE, S. G.; SNOW, R. W.; BROOKER, S. Plasmodium infection and its risk factors in eastern Uganda. **Malar. J.** 9: 2, 2010.

PULLAN, R. L.; BROOKER, S. J. The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. **Parasit Vectors.** 5(81), 2012.

PULLAN, R. L.; SMITH, J. L.; JASRASARIA, R.; BROOKER, S. J. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasit Vectors.** 7: 37, 2014.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. **Nat Rev Microbiol.** 4: 849-856, 2006.

QUINTERO, J. P.; SIQUEIRA, A. M.; TOBÓN, A.; BLAIR, S.; MORENO, A.; ARÉVALOHERRERA, M.; LACERDA, M. V. G.; VALENCIA, S. H. Malaria-related anemia: a Latin American perspective. **Men. Inst. Oswaldo Cruz.** 106: 91-104, 2011.

RASO, G. et al. Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Côte d'Ivoire. **Int. J. Epidemiol.** 33, 1092–102, 2004.

REBÊLO, J. M. M.; DA SILVA, R. A.; FERREIRA, L. A.; VIEIRA, J. A. Anopheles

(Culicidae, Anophelinae) e a malária em Buriticupu-Santa Luzia, pré-Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 30: 2, 1997.

REINA, O. M. et al. Effects of chronic ascariasis and trichuriasis on cytokine production and gene expression in human blood: A cross-sectional study. **PLoS Negl Trop Dis.** 5(6): e1157, 2011.

RÉNIA L.; GOH, Y. S. Malaria Parasites: The Great Escape. **Front. Immunol.** 7: 463, 2016.

REUTERSHAN, J.; LEY, K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. **Crit care.** 8(6): 453-61, 2004.

RICHARDS, A. L. Tumor necrosis factor and associated cytokines in the host's response to malaria. **Int. J. Parasitol.** 27(10): 1251-1263, 1997.

RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nature medicine.** 19(2):168-78, 2013.

RILEY, E. M.; WAHL, S.; PERKINS, D. J.; SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria. **Parasite Immunol.** 28: 35-49. 2006.

RIGHETTI, A. A.; GLINZ, D.; ADIOSSAN, L. G. et al. Interactions and potential implications of *Plasmodium falciparum*-hookworm coinfection in different age groups in south-central cote d'ivoire. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** 6(11): ID e1889, 2012.

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; SÁNCHEZ, E.; VARGAS, M.; PICCOLO, C.; COLINA, R.; et al. Occurrence of thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria. **Clin. Infect. Dis.** 41: 130-131, 2005.

ROUSSILHON, C.; BRAUSSEUR, P.; AGNAMEY, P.; PERIGNON, J. L.; DRUILHE, P. Understanding human-*Plasmodium falciparum* immune interactions uncovers the immunological role of worms. **PloS One.** 5: e9309, 2010.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Immunology.** 24: 147, 2006.

SABCHAREON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D.; ATTANATH, P.; BOUHAROUN-TAYOUN, H.; CHANTAVANICH, P.; FOUCAULT, C.; CHONGSUPHAJASIDDHI, T.; DRUILHE, P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 45: 297-308, 1991.

SABOYÁ, M. I.; CATALÁ, L.; NICHOLLS, R. S.; AULT, S. K. Update on the mapping of prevalence and intensity of infection for soil-transmitted helminth infections in Latin America and the Caribbean: a call for action. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 9 (7): 2419, 2013.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature.** 415: 680-685, 2002.

- SAENZ, S. A.; TAYLOR, B. C.; ARTIS, D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. **Immunol Rev.** 226: 172-90, 2008.
- SALGAME, P.; YAP, G. S.; GAUSE, W. C. Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. **Nat. Immunol.** 14, 1118–1126, 2013.
- SANJEEV, S. M.; LUM, L. C. Biliary ascariasis from a rural setting: A case study. **Med & Health.** 7(2): 102-6, 2012.
- SATTABONGKOT, J.; TSUBOI, T.; ZOLLNER, G. E.; SIRICHAISINTHOP, J.; CUI, L. *Plasmodium vivax* transmission: changes for control? **Trends Parasitol.** 20(4): 192-198, 2004.
- SCACCABAROZZI, D.; DEROOST, K.; CORBETT, Y.; LAYS, N.; CORSETTO, P.; SALÈ, F. O.; VAN DEN STEEN, P. E.; TARAMELLI, D. Differential induction of malaria liver pathology in mice infected with *Plasmodium chabaudi* AS or *Plasmodium berghei* NK65. **Malar J.** 17(1):18, 2018.
- SCACCABAROZZI, D.; DEROOST, K.; LAYS, N.; OMODEO SALÈ, F.; 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.** 10(12): e0143195. 2015.
- SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nat. Rev. Immunol.** 5: 722–735, 2005.
- SCHNEBERGER, D.; AHARONSON-RAZ, K.; SINGH, B. Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. **Cell Tissue Res.** 343(1): 97-106.
- SCHWARZER, E.; ARESE, P. Phagocytosis of malarial pigment hemozoin inhibits NADPH-oxidase activity in human monocyte-derived macrophages. **Biochim. Biophys. Acta.** 1316:169–75., 1996.
- SCHWARZER, E.; TURRINI, F.; ULLIERS, D.; GIRIBALDI, G.; GINSBURG, H. D.; ARESE, P. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. **J. Exp. Med.** 176:1033–41, 1992.
- SCHERF, A.; POUVELLE, B.; BUFFET, P. A.; GYSIN, J. Molecular mechanisms of *Plasmodium falciparum* placental adhesion. **Cellular Microbiology.** 3: 125–131, 2001.
- SCHOLTE, R. G. C.; SCHUR, N.; BAVIA, M. E.; CARVALHO, E. M.; CHAMMARTIN, F.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Spatial analysis and risk mapping of soil-transmitted helminths in Brazil, using Bayesian geostatistical models. **Geospat Health.** 2013, in press.
- SCHMIEG, J.; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; TSUJI, M. The role of natural killer T

cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites. **Microbes Infect.** 5: 499-506, 2003.

SEHGAL, V. M.; SIDDJQUI, W. A.; ALPERS, M. P. A. seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in infants. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.** 83 Suppl: 105-106, 1989.

SCHWARTZ, C.; HAMS, E.; FALLON, P. G. Helminth Modulation of Lung Inflammation. **Trends Parasitol.** 34: 388–403, 2018.

SERCUNDES, M. K.; ORTOLAN, L. S.; DEBONE, D.; SOEIRO-PEREIRA, P. V.; GOMES, E.; AITKEN, E. H., et al. Targeting Neutrophils to Prevent Malaria Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. **PLoS Pathog.** 12(12): e1006054, 2016.

SHAN, Y.; LIU, J.; JIANG, Y. J.; SHANG, H.; JIANG, D.; CAO, Y. M. Age-related susceptibility and resistance to nonlethal *Plasmodium yoelii* infection in C57BL/6 mice. **Folia parasitologica.** 59(3):153-61, 2012.

SHANKS, G. D. Control and elimination of *Plasmodium vivax*. **Adv. Parasitol.** 80 (5): 301-341, 2012.

SHAPIRO, A. E.; TUKAHEBWA, E. M.; KASTEN, J. et al. Epidemiology of helminth infections and their relationship to clinical malaria in southwest Uganda. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.** 99(1): 18–24, 2005.

SHAW, T. N.; STEWART-HUTCHINSON, P. J.; STRANGWARD, P.; DANDAMUDI, D. B.; COLES, J. A; VILLEGAS-MENDEZ, A. et al. Perivascular Arrest of CD8+ T Cells Is a Signature of Experimental Cerebral Malaria. **PLoS Pathog.** 11(11): e1005210. 2015.

SHIN, S. C. J.; VANDERBERG, J. P. TERZAKIS, J. A. Direct infection of hepatocytes by sporozoites of *Plasmodium berghei*. **J. Protozool.** 29: 448-454, 1982.

SIDDIQUI, A. A.; SINGH, N; SHARMA, Y. D. Expression and purification of a *Plasmodium vivax* antigen–PvTARAg55 tryptophan-and alanine-rich antigen and its immunological responses in human subjects. **Vaccine.** 26 (1): 96-107, 2007.

SILVA, N. R. et al. Morbidity and mortality due to ascariasis: re-estimation and sensitivity analysis of global numbers at risk. **Trop. Med. Intern. Health.** 2(6): 519-28, 1997a.

SILVA, N. R. et al. Morbidity and mortality due to *Ascaris*-induced intestinal obstruction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 91:31-6, 1997b.

SILVEIRA, M. R.; NUNES, K. P.; CARA, D. C.; SOUZA, D. G.; CORREA, A. J. R.; TEIXEIRA, M. M. et al. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyper responsiveness in

rats. **Infect Immun.** 70: 6263–6272, 2002.

SIMPSON, J. A.; SILAMUT, K.; CHOTIVANICH, K.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; WHITE, N. J. Red cell selectivity in malaria: a study of multiple-infected erythrocytes. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.** 93: 165–168, 1999.

SINDRILARU, A.; PETERS, T.; WIESCHALKA, S.; BAICAN, A.; PETER, H.; et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. **J. Clin. Invest.** 121(3): 985-97.

SITPRIJA, V. Renal failure in malaria. **The Lancet.** 289(7483): 185–188, 1967.

SLOTVED, H. C.; ERIKSEN, L.; MURRELL, K. D.; NANSEN P. Early *Ascaris suum* migration in mice as a model for pigs. **J. Parasitol.** 84:16–18, 1998.

SMITH, R. C.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; JACOBS-LORENA, M. The Plasmodium bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 109: 644-661, 2014.

SOKHNA, C.; LE HESRAN, J. Y.; MBAYE, P. A.; AKIANA, J.; CAMARA, P.; DIOP, M. et al. Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal. **Malar. J.** 3: 43, 2004.

SOLDATI, D.; FOTH, B. J.; COWMAN, A. F. Molecular and functional aspects of parasite invasion. **Trends in Parasitology.** 20: 567-574, 2004.

SONI, R.; SHARMA, D.; RAI, P.; SHARMA, B.; BHATT, T. K. Signaling Strategies of Malaria Parasite for Its Survival, Proliferation, and Infection during Erythrocytic Stage. **Front. Immunol.** 8: 349, 2017.

SOUZA, V. M. O. et al. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*. **Cytokine.** 28: 92-100, 2004.

SPIEGEL, A.; TALL, A.; RAPHENON, G.; TRAPE, J. F.; DRUILHE, P. Increased frequency of malaria attacks in subjects co-infected by intestinal worms and Plasmodium falciparum malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.** 97(2): 198–199, 2003.

SPRENT, J. F. Anatomical distinction between human and pig strains of *Ascaris*. **Nature.** 170(4328): 627-8, 1952.

STEPHENS, R.; CULLETON, R. L.; LAMB, T. J. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. **Trends in parasitology.** 28(2):73-82, 2012.

STEVENSON, M. M.; LYANGA, J. J.; SKAMENE, E. Murine malaria: genetic control of resistance to *Plasmodium chabaudi*. **Infect Immun.** 38: 80–8, 1982.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nat. Rev. Immunol.** 4:

169- 180, 2004.

STEWART, T. B.; HALE, O. M. Losses to internal parasites in swine production. **J. Anim. Sci.** 66(6): 1548-1554, 1988.

STRATH M, WARREN DJ, SANDERSON CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J. Immunol. Methods.** 83: 209–215, 1985.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLOCK, J.M.; MENARD.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science.** 313(5791): 1287-1290, 2006.

SUPALI, T.; VERWEIJ, J. J.; WIRIA, A. E.; DJUARDI, Y.; HAMID, F.; KAISAR, M. M. et al. Polyparasitism and its impact on the immune system. **International journal for parasitology.** 40(10): 1171-6, 2010.

SUSI, H.; BARRES, B.; VALE, P. F.; LAINE, A. L. Co-infection alters population dynamics of infectious disease. **Nature communications.** 6: 5975, 2015.

TAKATA, I. **Experimental infection of man with Ascaris of man and the pig.** 1951.

TAKEM, E. N.; ROCA A.; CUNNINGTON, A. The association between malaria and non-typhoid Salmonella bacteraemia in children in sub-Saharan Africa: a literature review. **Malar. J.** 13: 400, 2014.

TAYLOR, W. R.; HANSON, J.; TURNER, G. D.; WHITE, N. J.; DONDORP, A. M. Respiratory manifestations of malaria. **Chest.** 142, 492–505. 2012.

TAYLOR, W. R. J.; WHITE, N. J. Malaria and the lung. **Clin. Chest Med.** 23(2): 457-68, 2002.

THAMSBORG, S.M.; NEJSUM, P.; MEJER, H. **Impact of *Ascaris suum* in livestock.** In: Holland C, ed. *Ascaris the neglected parasite.* London: Academic Press, p. 363-381, 2013.

THEANDER, T. G.; BYGBJERG, I. C.; JACOBSEN, L.; JEPSEN, S.; LARSEN, P. B.; KHARAZMI, A. Low parasite specific T cell response in clinically immune individuals with low grade *Plasmodium falciparum* parasitaemia. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.** 80:1000–1, 1986.

THOMPSON, J.; COOKE R.E.; MOORE, S.; ANDERSON, L.F.; JANSE, C.J.; WATERS, A.P. PTRAMP; a conserved Plasmodium thrombospondin-related apical merozoite protein. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 134, 225–23, 2004.

TJITRA, E.; ANSTEY, N. M.; SUGIARTO, P.; WARIKAR, N.; KENANGALERN, 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**. 5: 128, 2008.

TOURE-BALDE, A.; SARTHOU, J. L.; ARIBOT, G.; MICHEL, P.; TRAPE, J. F.; et al. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. **Infect Immun**. 64: 744–50. 195, 1996.

TROYE-BLOMBERG, M.; BERZINS, K. Immune interactions in malaria co-infections with other endemic infectious diseases: implications for the development of improved disease interventions. **Microbes Infect**. 10: 948–52, 2008.

TURNER, J. D. et al. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. **The Journal of Infectious Diseases**. 188(11): 1768-75, 2003.

UMETSU, S. et al. Intestinal ascariasis at pediatric emergency room in a developed country. **World J. Gastroenterol**. 20(38): 14058-62, 2014.

URBAN, B. C.; FERGUSON, D. J.; PAIN, A.; WILLCOX, N.; PLEBANSKI, M.; AUSTYN, J. M.; et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**. 400(6739): 73–7, 1999.

VAL, F.; MACHADO, K.; BARBOSA, L.; SALINAS, J. L.; SIQUEIRA, A. M.; COSTA ALECRIM, M. G.; et al. Respiratory Complications of *Plasmodium vivax* Malaria: Systematic Review and Meta-Analysis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 97(3), 2017.

VAN DEN STEEN, P. E.; DEROOST, K.; DECKERS, J.; VAN HERCK, V.; STRUYF, S.; OPDENAKKER, G. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Trends Parasitol**. 29: 346–358, 2013.

VAN DEN STEEN, P. E.; GEURTS, N.; DEROOST, K.; VAN AELST, I.; VERHENNE, S.; et al. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. 181: 957–968, 2010.

VAN DER HEYDE, H. C.; BAUER, P.; SUN, G.; CHANG, W. L.; YIN, L.; FUSELER, J.; GRANGER, D. N. Assessing vascular permeability during experimental cerebral malaria by a radiolabeled monoclonal antibody technique. **Infect Immun**. 69(5): 3460-3465, 2001.

VANDERMOSTEN, L.; PHAM, T.; POSSEMIERS, H.; KNOOPS, S.; VAN HERCK, E.; DECKERS, J.; FRANKE-FAYARD, B.; LAMB, T. J.; JANSE, C. J.; OPDENAKKER, G.; PHILIPPE E. VAN DEN STEEN, P. E. Experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome is dependent on the parasite-host combination and coincides with normocyte invasion. **Malar. J**. 17, 102, 2018.

VAUMOURIN, E.; VOURC'H, G.; GASQUI, P.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. **Parasites & vectors**. 8: 545, 2015.

- VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**. 24(2): 179–89, 2006.
- VINK, A.; WARNIER, G.; BROMBACHER, F.; RENAULD, J. C. Interleukin 9-induced in vivo expansion of the B-1 lymphocyte population. **J. Exp. Med.** 189:1413–1423, 1999.
- VLACHOU, D.; SCHLEGELMILCH, T. RUNN, E.; MENDES, A.; KAFATOS, F. C. The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 16 (4): 384- 391, 2006.
- WALTHER, M.; JEFFRIES, D.; FINNEY, O. C.; NJIE, M.; EBONYI, A.; DEININGER, S.; LAWRENCE, E.; NGWA-AMAMBUA, A.; JAYASOORIYA, S.; CHEESEMAN, I. H.; GOMEZ-ESCOBAR, N.; OKEBE, J.; CONWAY, D. J.; RILEY, E. M. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. **PLoS Pathog.** 5:e1000364, 2009.
- WANG, J. et al. Biliary ascariasis in a bile duct stones-removed female patient. **World. J. Gastroenterol.** 19(36): 6122-24, 2013.
- WANG, M.; FENG, Y.; PANG, W.; QI, Z.; ZHANG, Y.; GUO, Y.; et al. Parasite densities modulate susceptibility of mice to cerebral malaria during co-infection with *Schistosoma japonicum* and *Plasmodium berghei*. **Malar J.** 13(1):116, 2014.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Genetic variability in response to infection: malaria and after. **Genes and immunity**. 3 (6): 331-337, 2002.
- WEBSTER, D., HILL, A. V. Progress with new malaria vaccines. **Bull World Health Organ.** 81: 902-909, 2003.
- WERE, T. et al. Bacteremia in Kenyan children presenting with malaria. **J. Clin. Microbiol.** 49: 671–6, 2011.
- WICKRAMASINGHE, S. N.; ABDALLA, S. H. Blood and bone marrow changes in malaria. **Best Practice & Research Clinical Haematology.** 13: 277-299, 2000.
- WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. **Malar. J.** 10:297, 2011.
- WHITE, N. J.; TURNER, G. D.; MEDANA, I. M.; DONDORP, A. M.; DAY, N. P. The murine cerebral malaria phenomenon. **Trends Parasitol.** 26: 11–15, 2010.
- WHITWORTH, J.; MORGAN, D.; QUIGLEY, M.; SMITH, A.; MAYANJA, B.; EOTU, H.; OJWIYA, A. Effect of HIV-1 and increasing immunosuppression on malaria parasitaemia and clinical episodes in adults in rural Uganda: a cohort study. **The Lancet.** 356(9235): 1051–1056, 2000.

WINZELER, E. A. Advances in parasite genomics: from sequences to regulatory networks. **PLoS Pathog.** 2009.

WONG, C. K.; et al. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 37(1): 85-96, 2007.

WOODBERRY, T.; MINIGO, G.; PIERA, K. A.; AMANTE, F. H.; PINZON-CHARRY, A.; GOOD, M. F.; et al. Low-level *Plasmodium falciparum* blood-stage infection causes dendritic cell apoptosis and dysfunction in healthy volunteers. **J. Infect. Dis.** 206:333–40, 2012.

WOOLHOUSE, M. E.; WEBSTER, J. P.; DOMINGO, E.; CHARLESWORTH, B.; LEVIN, B. R. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. **Nature Genet.** 32: 569–577, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Drug resistance in malaria.** 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Eliminating malaria.** 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Severe malaria.** Trop. Med. Int. Health. 19 (Suppl. 1), 7–131, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Soil-transmitted helminthiases: eliminating soil-transmitted helminthiases as a public health problem in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-202.** 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Health Organization Report. Annex Table 2: deaths by cause, sex, and mortality stratum in WHO regions and annex Table 3: burden of disease in DALYs by cause, sex and mortality stratum in WHO regions.** Geneva: World Health Organization; p. 186-193, 2002a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Health Organization Report Series. Prevention and control of intestinal parasitic infections.** Geneva: World Health Organization, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Health Organization Technical Report Series. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis.** Geneva: World Health Organization, 63p., 2002b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report.** 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report.** 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report.** 2018.

WRIGHT, G. J.; RAYNER, J. C. *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Invasion: Combining

- Function with Immune Evasion. **PLoS Pathog.** 10(3): e1003943, 2014.
- WUNDERLICH, C. M.; DELIC, D.; BEHNKE, K.; MERYK, A.; STROHLE, P.; et al. Cutting edge: Inhibition of IL-6 trans-signaling protects from malaria-induced lethality in mice. **J. Immunol.** 188: 4141–4144, 2012.
- WYKES, M. N.; GOOD, M. F. What really happens to dendritic cells during malaria? **Nat. Rev. Microbiol.** 6: 864-870, 2008.
- WYKES, M. N.; ZHOU, Y. H.; LIU, X. Q.; GOOD, M. F. *Plasmodium yoelii* can ablate vaccine-induced long-term protection in mice. **J. Immunol.** 175: 2510–6, 2005.
- WYNN, T. A.; BARRON, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Semin Liver Dis.** 30(3): 245-57, 2010.
- YATICH, N. J.; YI, J.; AGBENYEGA, T. et al., Malaria and intestinal helminth co-infection among pregnant women in Ghana: prevalence and risk factors. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 80(6): 896–901, 2009.
- ZAINAL-ABIDIN, B.; A. H.; ROBIAH, Y.; ISMAIL, G. *Plasmodium berghei*: Eosinophilic depression of infection in mice. **Experimental Parasitology.** 57(1), 20–24, 1984.
- ZARBOCK, A.; ALLEGRETTI, M.; LEY, K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. **Br. J. Pharmacol.** 155(3): 357-64, 2008.
- ZIEGELBAUER, K. et al. Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: systematic review and meta-analysis. **PLoS Med.** 9(1): e1001162, 2012.

9. ANEXOS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 21/2018

Título do projeto: Aspectos fisiopatológicos e imunológicos associados à proteção ou modulação durante a coinfeção experimental por *Ascaris suum* e *Plasmodium berghei*

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Lilian Lacerda Bueno

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Parasitologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado com recomendação na reunião do dia 21/05/2018. Validade: 21/05/2018 à 20/05/2023 Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.

Belo Horizonte, 21/05/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br