

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Karla Caroline Marques de Oliveira

**IMPLICAÇÕES DA NADPH OXIDASE PARA AS ALTERAÇÕES CARDÍACAS
INDUZIDAS PELA MALÁRIA GRAVE**

Belo Horizonte
2022

Karla Caroline Marques de Oliveira

**IMPLICAÇÕES DA NADPH OXIDASE PARA AS ALTERAÇÕES CARDÍACAS
INDUZIDAS PELA MALÁRIA GRAVE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Co-orientador: Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau

Belo Horizonte
2022

043

Oliveira, Karla Caroline Marques de.

Implicações da NADPH oxidase para as alterações cardíacas induzidas pela malária grave [manuscrito] / Karla Caroline Marques de Oliveira. – 2022.
90 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira. Coorientador: Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Malária. 3. Coração. 4. Estresse Oxidativo. 5. NADPH Oxidases. I. Teixeira, Mauro Martins. II. Cau, Stêfany Bruno de Assis. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 364 DE KARLA CAROLINE MARQUES DE OLIVEIRA

"Implicações da Nadph Oxidase Para As Alterações Cardíacas Induzidas Pela Malária Grave"

KARLA CAROLINE MARQUES DE OLIVEIRA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **29 de novembro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia, FMRP/USP
Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado, ICB/UFPA
Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca, ICB/UFMG
Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini, ICB/UFMG
Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau, ICB/UFMG – Coordenador
Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 29 de novembro de 2022

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Stéfany Bruno de Assis Cau**, **Professor do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini**, **Professor do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, **Professora do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Martins Teixeira**, **Professor do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 19:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alejandro Ferraz do Prado**, **Usuário Externo**, em 16/12/2022, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia**, **Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 12:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1920311** e o código CRC **A9E35B8D**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de ressaltar que esta Tese de Doutorado foi realizada com várias mãos. Esse singelo texto não será suficiente para expressar a gratidão, carinho e amor que tenho por todas as pessoas que me impulsionaram ao longo de vários anos no caminho acadêmico.

Dito isto, gostaria de expressar o meu mais profundo amor e gratidão à minha família, sem meus pais, Sônia e Luiz, e minha irmã Louize. A história da minha vida e meu caminho até este momento não seria o mesmo se eu não tivesse vocês caminhando ao meu lado. Eu os amo de forma incondicional. Muito obrigada pelo amor, pelas palavras de suporte, pelas risadas e por sempre me aproximarem do meu lar sempre que necessário.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof^o. Dr. Mauro Martins Teixeira. Obrigada pela oportunidade de tornar possível a realização deste trabalho. Obrigada pelas ideias, por todo suporte intelectual e material para a execução deste projeto. Admiro muito a forma como você faz ciência.

Gostaria de agradecer ao meu co-orientador, Prof^o. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau. Não poderia pedir co-orientador melhor. Não tenho palavras para expressar a minha mais profunda gratidão por me acompanhar ao longo desse doutorado, nos altos e baixos. Obrigada até por pegar no meu pé, me incentivar a ser mais crítica, a expor mais as minhas ideias e por acreditar no meu trabalho, por mais que nem eu mesmo acreditasse. Minha admiração é imensa. Muito obrigada!

Gostaria de agradecer ao meu companheiro de vida. Joaquim, você é o meu amor, meu ombro amigo, meu confidente e mão de obra não remunerada quando estava domingo no laboratório. Obrigada por nunca me deixar cair e por sempre me escutar com carinho e com ideias. Obrigada por acreditar em mim. Te amo.

Gostaria de agradecer aos professores,

À Prof^a. Dra. Marina Castor, obrigada por todas as ideias e ensinamentos ao longo desses anos. Obrigada por sempre estar disponível para nos orientar e auxiliar.

À Prof^ª. Dra. Carla Ceron, pela colaboração importante para que conseguíssemos realizar análises cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^ª. Dra. Daniela Bonaventura, muito obrigada pelas conversas e pelos ensinamentos fora e dentro de sala de aula. Obrigada por sempre abrir as portas do seu laboratório e por me incentivar em diversas oportunidades.

Aos professores do departamento de Farmacologia da UFMG que sempre estiveram dispostos a ajudar, abrindo as portas dos seus laboratórios e auxiliando de alguma forma na construção deste trabalho.

Gostaria de agradecer aos meus familiares, amigos e colegas,

Barbara Berg, muito obrigada por tudo que você fez por mim. Eu não tenho palavras que consigam expressar o quanto sua presença ao longo desses anos foi valiosa. Você me ensinou tanto sobre companheirismo, ciência, amizade e vida. Eu tenho a mais profunda admiração e carinho por você. Muito obrigada, Bergzitcha!

Alessandra Silva, muito obrigada pelas conversas, ensinamentos e parceria imprescindível para desenvolvimento deste trabalho. Não tenho palavras que sejam suficientes para agradecer a todo seu esforço.

Patrícia, Alexandre, Karol, Aline, Ana Flávia, Tales, Hilton, Rafael e Yuri, parceiros de laboratório, muito obrigada pela convivência, pelos ensinamentos, experimentos e parceria ao longo desses anos. Vocês sempre possibilitaram que eu me sentisse pertencente a algum lugar.

Natália Araújo, Naiara Assis e André Monteiro, vocês não imaginam o quanto agradeço pelas conversas e pela amizade. Vocês estiveram sempre dispostos a me ajudar nos momentos em que mais precisava. Me ajudaram com conversas, experimentos e rindo. Obrigada pelo apoio e incentivo constante.

Gilmara e Barbarella, minhas orientadoras de TCC e Mestrado. Muito obrigada! Vocês são mulheres que admiro imensamente e sempre foram guias importantes para o meu caminho.

Minha cunhada Suzana, obrigada sempre por tudo! Minha irmã.

Drica, Daniele, Adam, Gilna, Leila, Adriane, Bianca, Layse, Chiara, Dayane, Monique e Carla. Vocês me impulsionaram a sempre continuar e me mantiveram, de certa forma, com os pés no chão. Obrigada pelo amor que me alcança.

Agradeço aos professores Rita Tostes, Alejandro Prado, Silvia Guatimosim e Luciano Capettini por aceitarem participar da composição da banca avaliadora e ajudarem a enriquecer a discussão deste trabalho.

Gostaria de agradecer aos funcionários que trabalham na UFMG, principalmente ao Webster, Rinaldo e Cida. Esse trabalho tem imensa contribuição de vocês.

Por fim, gostaria de agradecer à Universidade Federal de Minas Gerais, ao PPG FisFar, às agências de fomento, CAPES, FAPEMIG e CNPq.

“É necessário se espantar, se indignar e se contagiar, só assim é possível mudar a realidade.” (Nise da Silveira, em entrevista realizada em 1991).

RESUMO

A malária, uma doença endêmica no norte do Brasil, pode ter evolução clínica grave, caso não tratada adequadamente. Apesar de raras, complicações cardíacas foram associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade por malária. O estresse oxidativo é um fator que desencadeia dano cardíaco, porém, não há estudos demonstrando a sua relação com disfunção cardíaca na malária grave. Camundongos Balb/C machos receberam 10^6 eritrócitos infectados com *Plasmodium chabaudi* e foram acompanhados por 7, 14 e 28 dias pós-infecção (dpi). Avaliou-se função cardíaca pelo método de Langendorff. A peroxidação lipídica, a atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase, e os níveis de glutathiona reduzida (GSH) cardíacos foram determinados colorimetricamente. Aos 7 e 14 dpi, os animais apresentam perda de peso, anemia e aumento do fígado e baço. Corações isolados dos animais infectados apresentaram maior resposta basal e hiperresponsividade à isoprenalina para os parâmetros pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PVDE), derivadas da pressão pela derivada do tempo na contração (dP/dt_{max}) e no relaxamento (dP/dt_{min}), comparando-se ao grupo controle (não infectado). Houve aumento da peroxidação lipídica e inibição da SOD no 14º dpi. Aos 28 dpi, a função cardíaca foi normalizada, acompanhando o fim da parasitemia. Para avaliar a participação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NOX), os animais foram tratados com apocinina do 7º ao 14º dpi (30 mg/kg/dia, gavagem) e foram quantificadas as citocinas no coração. A apocinina reverteu a hipercontratibilidade cardíaca causada pela malária grave, em estado basal, em resposta ao aumento da pressão de enchimento e sob estímulo com isoprenalina. O tratamento também reduziu o estresse oxidativo e as citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) cardíacas, porém, não houve alteração dos sinais da doença. Para confirmação da participação da NOX2 nas alterações cardíacas, foram realizados experimentos em animais NOX2^{-/-}. Animais NOX2^{-/-} foram protegidos da disfunção cardíaca durante a malária, sem alteração da parasitemia. Portanto, a inibição da NOX, mais especificamente da NOX2, reverte a hipercontratibilidade cardíaca, sem alterar o curso da infecção. Esses resultados reforçam que a NOX é a principal fonte de estresse oxidativo durante a malária grave e a inibição da enzima protege os animais das alterações cardíacas.

Palavras-chave: Malária grave. NOX. Coração.

ABSTRACT

Malaria is an endemic disease in the northern region of Brazil, which can course with severe systemic complications. Although rare, cardiac disorders are associated with higher morbidity and mortality for malaria. Oxidative stress is a known factor triggering cardiac injury. Nevertheless, the relationship between heart damage and oxidative stress during severe malaria is unclear. In this study, male BALB/c mice were infected with 10^6 red blood cells infected with *Plasmodium chabaudi* and they were evaluated at 7, 14 e 28 days post-infection (dpi). Cardiac function was assessed *ex vivo* by the Langendorff method. Cardiac lipid peroxidation, superoxide dismutase (SOD), catalase, and reduced glutathione levels (GSH) were determined by colorimetric standard methods. Body weight loss, anemia, hepatomegaly, and splenomegaly were found at 7 and 14 dpi. Perfused hearts of infected mice had greater basal left ventricular developed pressure (LVDP), maximum (dP/dt_{max}) and minimum (dP/dt_{min}) derivatives of left ventricular pressure, as well as hyperresponsiveness to isoprenaline compared to the control (uninfected). Increased lipid peroxidation and reduced SOD activity was observed at 14 dpi. At 28 dpi, heart function was normalized, followed by no parasitemia. To analyze the role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) in heart dysfunction during experimental malaria, mice were treated with apocynin from the 7th to 14th dpi (30 mg/kg/day, gavage). Local oxidative stress and cytokine levels were determined. Apocynin reversed cardiac hypercontractility at baseline, under a progressive filling pressure increment and isoprenaline stimulation. Also, the treatment reduced oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in the cardiac tissue, with no effects in the clinical signs of the disease. To confirm the involvement of NOX2 isoform in heart hypercontractility, NOX2 knockout mice (NOX2^{-/-}) were inoculated with parasitized red blood cells. NOX2^{-/-} infected mice developed similar parasitemia and other clinical signals, however, were protected from the cardiac hypercontractility induced by malaria. Therefore, NOX2 inhibition selectively reverses heart alterations during acute phase of malaria. These show that NOX is the main cardiac source of reactive oxygen species during severe malaria, and its inhibition protects animals from cardiac changes.

Keywords: Severe malaria. NOX. Heart.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo eritrocítico que ocorre em animais infectados de forma natural pelo <i>Plasmodium sp</i>	22
Figura 2 - Países endêmicos para malária. Mapa da mortalidade por malária no ano de 2020 e comparação com ano de 2015	25
Figura 3 - Países endêmicos para malária. Mapa da incidência da malária no ano de 2020 e comparação com ano de 2015	26
Figura 4 - Áreas de risco para malária. Mapa de risco por município de infecção no ano de 2021	27
Figura 5 - Malária grave. Lesão em microvasos e citoaderência de agregados celulares que desencadeiam as principais alterações inflamatórias causadas pela doença	29
Figura 6 - Proteínas contráteis no cardiomiócito	32
Figura 7- Acoplamento excitação-contração no cardiomiócito	33
Figura 8 - Sinalização β -adrenérgica. Mecanismo de ação intracelular de agonista β -adrenérgico no cardiomiócito	36
Figura 9 - Isoformas de NADPH oxidase. Isoformas de NOX presentes em diversos tipos celulares	38
Figura 10 - Sistema pró-oxidantes e antioxidantes em cardiomiócitos em diferentes condições	40
Figura 11 - Caracterização da infecção por <i>Plasmodium chabaudi</i> em camundongos BALB/c	52
Figura 12 - Avaliação das alterações funcionais cardíacas em animais infectados por <i>Plasmodium chabaudi</i>	53
Figura 13 - Avaliação do peso cardíaco de animais infectados com <i>Plasmodium chabaudi</i>	54
Figura 14 - Avaliação da peroxidação lipídica	55
Figura 15 - Sistemas antioxidantes em corações de camundongos infectados com <i>Plasmodium chabaudi</i>	56
Figura 16 - Efeitos da apocinina sobre os parâmetros da infecção por <i>Plasmodium chabaudi</i>	57
Figura 17 - Parâmetros hematológicos após tratamento com apocinina	58
Figura 18 - Reposta cardíaca ao aumento da pré-carga	59

Figura 19 - Avaliação da função cardíaca <i>ex vivo</i> após inibição do estresse oxidativo	60
Figura 20 - Efeito da inibição das óxido nítrico sintases sobre os parâmetros de contratilidade à isrenalina entre os grupos experimentais	61
Figura 21 - Inibição das óxido nítrico sintases	62
Figura 22 - Avaliação <i>in situ</i> de estresse oxidativo	63
Figura 23 - Avaliação da peroxidação lipídica	64
Figura 24 - Sistema antioxidante, SOD	65
Figura 25 - Score histopatológico	66
Figura 26 - Quantificação de citocinas	67
Figura 27 - Caracterização da infecção em animais NOX2 ^{-/-}	68
Figura 28 - Score histopatológico	69
Figura 29 - Avaliação da função cardíaca <i>ex vivo</i> em animais NOX2 ^{-/-}	70
Figura 30 - Envolvimento da NOX2 nas alterações cardíacas desenvolvida durante a MEMG	78

LISTA DE TABELAS E CÁLCULO

Tabela 1 - Número total de casos de malária por estado brasileiro. Casos totais de malária no Brasil no ano de 2021	29
Tabela 2 - Grupos experimentais	45
Cálculo 1 - Fórmula para determinação da atividade de SOD	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
ATP	Adenosina trifosfato
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
BSA	Soroalbumina bovina
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAMKII	Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina
CO ₂	Gás carbônico
DHE	Sonda di-hidroetidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPI	Dias pós-infecção
dP/dt	Derivada da pressão pela derivada do tempo
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
H&E	Hematoxilina e Eosina
Gp91phox	Subunidade da NOX2
GSH	Glutathiona reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN-γ	Interferon gamma
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IL	Interleucina
K ⁺	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
L-NAME	<i>N</i> -nitro-L-arginina–metil éster
MDA	Malondialdeído
MEMG	Modelo experimental de malária grave
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NCX	Trocador de Ca ²⁺ e Na ⁺
NO	Óxido nítrico
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase
NOX2 ^{-/-}	<i>Knockout</i> para NOX2
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	O-fenilenodiamina
·O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PBS	Tampão fosfato-salino
PDVE	Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
PKA	Proteína quinase A

PMSF	Fenilmetilsulfonil
RRP	Receptores de reconhecimento padrão
RyR2	Receptores de rianodina do tipo 2
SERCA	Bomba de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNA	Sistema nervoso autônomo
SOD	Superóxido dismutase
sVCAM	Molécula 1 de adesão de célula vascular
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao TBA
Th17	Células T auxiliares 17
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF-(alfa)	Fator de necrose tumoral-alfa
Tnl	Troponina I

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Características gerais da malária.....	21
2.1.1 Principais espécies que causam malária em mamíferos.....	23
2.2 Epidemiologia.....	24
2.2.1 Dados epidemiológicos mundiais.....	24
2.2.2 Dados epidemiológicos no Brasil.....	26
2.3 Fisiopatologia da malária.....	28
2.3.1 Malária grave.....	28
2.3.2 Alterações cardíacas durante a malária grave.....	30
2.4 Controle fisiológico e fisiopatológico da função cardíaca.....	31
2.4.1 Contratilidade cardíaca: mecanismo de excitação – contração.....	31
2.4.3 Contratilidade cardíaca: lei de Frank-Starling.....	34
2.4.3 Contratilidade cardíaca: controle autônomo.....	35
2.5 Mecanismos moleculares e de estresse oxidativo envolvidos em doenças cardíacas.....	37
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Animais experimentais.....	43
4.2 Infecção com <i>Plasmodium chabaudi</i> , MEMG grave.....	44
4.3 Determinação da parasitemia.....	44
4.4 Avaliação do peso corporal, peso de órgãos-alvo e do coração.....	45
4.5 Hemograma.....	45
4.6 Avaliação da função cardíaca <i>ex vivo</i> – Langendorff.....	45
4.7 Avaliação histopatológica do coração.....	46
4.8 Dosagem de proteínas.....	46
4.9 Avaliação da peroxidação lipídica.....	47
4.10 Detecção de espécies reativas de oxigênio <i>in situ</i>	47
4.11 Preparação do tecido e quantificação dos sistemas antioxidantes.....	48
4.11.1 Determinação da atividade tecidual da superóxido dismutase (SOD).....	48

4.11.2 Determinação da atividade tecidual da catalase	49
4.11.3 Quantificação da glutathiona reduzida (GSH)	49
4.12 Quantificação de citocinas	49
4.13 Análise estatística	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Os animais infectados com <i>Plasmodium chabaudi</i> apresentam sinais graves da infecção.....	51
5.2 Os animais infectados com <i>Plasmodium chabaudi</i> apresentaram alterações funcionais cardíacas	52
5.3 Os animais infectados com <i>Plasmodium chabaudi</i> apresentaram estresse oxidativo no tecido cardíaco.....	54
5.4 A inibição da NADPH oxidase não alterou o curso da infecção por <i>Plasmodium chabaudi</i>	56
5.5 A inibição da NADPH oxidase modificou os parâmetros hematológicos encontrados durante a malária	57
5.6 A inibição da NADPH oxidase reverteu a hipercontratibilidade cardíaca em resposta ao aumento da pré-carga cardíaca e às concentrações crescentes de isoprenalina.....	58
5.7 A óxido nítrico sintase (NOS) não participa das alterações cardíacas induzidas por NADPH oxidase	61
5.8 A inibição da NADPH oxidase reverteu o estresse oxidativo no coração durante a infecção por <i>Plasmodium chabaudi</i>	62
5.9 Influência da inibição da NADPH oxidase nos parâmetros inflamatórios.....	65
5.10 A deleção da NOX2 não altera o curso da malária grave	68
5.11 A ausência da NOX2 impediu o desenvolvimento de disfunção cardíaca durante a infecção por <i>Plasmodium chabaudi</i>	70
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

A população mundial apresenta alta incidência de doenças parasitárias, que causam elevadas taxas de morbidade e mortalidade, limitando a qualidade de vida principalmente em áreas consideradas endêmicas para parasitoses. As doenças parasitárias, independente da presença de um vetor, estão amplamente associadas a situações socioeconômicas precárias (TORGERSON et al., 2015).

Os protozoários são os principais agentes etiológicos causadores de infecções parasitárias no mundo. Mais de 1 bilhão de pessoas no mundo estão infectadas por protozoários. Acredita-se que existem diversas espécies de protozoários que afetam de forma grave a saúde humana e, normalmente, o maior número de casos dessas doenças ocorrem em países com médio a baixo índice de desenvolvimento econômico (CHEN et al., 2016).

Uma das infecções causadas por protozoários mais relevantes no mundo é a malária, causada por protozoários do gênero *Plasmodium sp.* Os relatos mais antigos que descrevem a malária foram encontrados em um documento escrito na China por volta de 2700 a.C. (BIANUCCI et al., 2015). Com o passar dos anos, a doença foi descrita em outros lugares do mundo. Na Grécia antiga, Hipócrates descreveu a doença ressaltando principalmente as características referentes a febre terçã e o contexto ambiental propício para o desenvolvimento dos protozoários e dos vetores (COX, 2010).

Em 1880, ocorreu um dos maiores avanços em relação as primeiras características relativas ao protozoário da malária e os sinais importantes presentes durante a infecção (COX, 2010). Charles Louis Aphonse Laveran, um médico francês que estava trabalhando em um hospital militar na Argélia, conseguiu identificar em amostras de sangue de um soldado corpúsculos esféricos que possuíam filamentos em movimento. A descoberta de Laveran foi descrita em um artigo, que posteriormente foi apresentado na Academia de Medicina em Paris. Em 1906, Laveran foi premiado com o Nobel de Medicina e Fisiologia pela descoberta do plasmódio (BRUCE-CHWATT, 1981).

Acredita-se que no mundo, em um século (1900 – 2000), a doença tenha causado em torno de 300 milhões de mortes, contabilizando cerca de 2% a 5% das mortes neste intervalo de tempo (CARTER et al., 2002).

No Brasil, o controle da malária se iniciou de forma efetiva a partir do início do século XX, sendo que a primeira campanha para prevenção da doença ocorreu em 1905, no estado de São Paulo, e a campanha foi organizada pelo médico Carlos Chagas (FERREIRA et al., 2016). Com o avanço territorial e industrial do Brasil, houve a necessidade do desenvolvimento de infraestrutura, como a instalação de usinas hidroelétricas, presença de grandes projetos de exploração mineral e expansão agropecuária para a região amazônica pertencente ao território brasileiro. Essa mudanças acabaram contribuindo para que a Amazônia brasileira se tornasse um território favorável para a presença dos vetores e consequentemente os agentes etiológicos da malária (MONTEIRO et al., 2022; WANGDI et al., 2022).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a malária é uma doença que ainda permanece como um desafio para vários países, principalmente alguns pertencentes ao continente africano (AREMU et al., 2022). A malária pode ser prevenida principalmente por medidas comuns de saúde pública, como o uso de inseticidas para controle do vetor, uso de mosquiteiros, repelentes, controle ambiental realizado, em parte, pelo controle do desmatamento, realização do diagnóstico de indivíduos infectados, uso de quimioprofilaxia em populações em risco de contaminação e, mais recentemente, o uso de vacinas aplicadas em crianças, que são o grupo populacional mais gravemente atingido pela doença (AREMU et al., 2022; DATOO et al., 2022; ZINSZER et al., 2022).

Do ponto de vista terapêutico, existem fármacos eficazes para o tratamento da malária e que são utilizados para tratar a infecção causada por diferentes espécies de *Plasmodium* (JEZEWSKI et al., 2022). Apesar da eficácia dos tratamentos e a redução no número de casos e mortes causadas pela infecção, nos últimos 10 anos, determinadas cepas, principalmente pertencentes a espécie *Plasmodium falciparum*, que causa malária grave, têm adquirido resistência a tratamentos disponíveis, como a artemisinina e a cloroquina (WARD et al., 2022).

A malária é uma doença que apresenta relevância científica principalmente para o desenvolvimento de vacinas e terapias farmacológicas que auxiliem na

eliminação do protozoário em diversas fases do ciclo de vida do mesmo e também tratem os sinais e sintomas presentes durante a doença, principalmente quando os indivíduos são infectados e desenvolvem a forma grave da doença (HEUSCHEN et al., 2021).

Apesar da existência de tratamentos e medidas preventivas eficazes para combate contra a malária, de acordo com a OMS, a cada ano são estimados gastos econômicos elevados para o combate à doença (WHO, 2021). Todavia, a malária ainda permanece um desafio, pois não existem vacinas eficazes a serem utilizadas na população adulta, ainda há mecanismos fisiopatológicos que precisam ser elucidados e é uma doença presente em diversos países com condições ambientais, de saúde, educacionais e socioeconômicas precárias, e a cada ano são traçadas metas, juntamente com os governos, para a eliminação da doença em países que ainda permanecem como áreas endêmicas e de risco (ANDRADE et al., 2022).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais da malária

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium sp.* e transmitida no momento em que mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles sp.*, principalmente *Anopheles darlingi* e *Anopheles gambiae*, fazem o repasto de sangue infectado para um hospedeiro. Existem em torno de 100 espécies de *Plasmodium sp.* que podem infectar diversas espécies de animais (BAIA-DA-SILVA *et al.*, 2019; MONROE *et al.*, 2022; WHITTY *et al.*, 2002).

O ciclo da infecção por *Plasmodium sp.* é complexo e existem diferentes estágios de desenvolvimento do protozoário (COX, 2010). Em seres humanos, a infecção natural ocorre quando, no momento do repasto sanguíneo, as fêmeas *Anopheles sp.* infectadas com *Plasmodium sp.* inoculam esporozoítos na circulação sanguínea periférica (**Fig. 1**). Os esporozoítos se encaminham até o fígado e se transformam em criptozoítas (BERNABEU *et al.*, 2021). Durante o desenvolvimento dos criptozoítas, há inúmeras divisões celulares assexuadas do protozoário. No estágio final do desenvolvimento hepático do protozoário, são formadas estruturas multinucleadas com 10.000 a 40.000 merozoítas no interior de estruturas celulares, denominadas esquizontes. Esta fase pré-eritrocítica dura em torno de 6 a 16 dias após a inoculação dos esporozoítas. Após este período, há ruptura dos esquizontes, liberando merozoítas, que infectam eritrócitos. Na fase eritrocítica, os eritrócitos são infectados por merozoítas, que utilizam o conteúdo proteico da célula para realizar a esquizogonia e o protozoário chega ao estágio de trofozoíto. Dentro do eritrócito, os trofozoítos se dividem formando um novo esquizonte, que irá provocar rompimento dos eritrócitos e liberação de mais merozoítos dando continuidade à fase eritrocítica. Os merozoítos presentes ao longo do ciclo são precursores da formação de formas sexuais dos protozoários, denominados gametócitos masculino e feminino. Os gametócitos são ingeridos pelos mosquitos fêmeas durante o repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo neste hospedeiro (**Fig. 1**) (BERNABEU *et al.*, 2021; GILLRIE *et al.*, 2017; GUTTERY *et al.*, 2022).

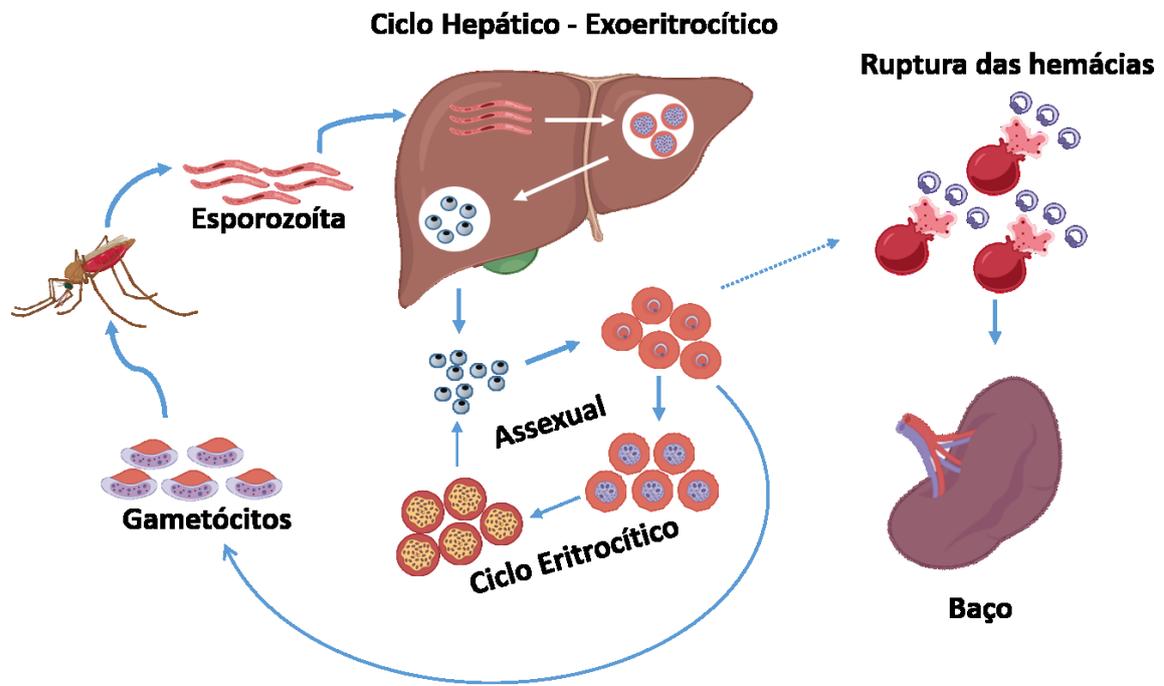


Figura 1: Ciclo eritrocítico que ocorre em animais infectados de forma natural pelo *Plasmodium* sp.

O ciclo hepático do protozoário em hospedeiro intermediário, como o homem, normalmente não causa sintomas nos indivíduos infectados. Os sintomas podem demorar de 8 até 30 dias após infecção para se tornarem presentes, dependendo da espécie de *Plasmodium*, da carga parasitária que foi transmitida pelo vetor e, por fim, pela ação do sistema imunológico do hospedeiro. Porém, quando os protozoários atingem o ciclo eritrocítico, se iniciam os principais sintomas característicos da infecção malárica (NAGARAJ *et al.*, 2013).

A malária, na fase sintomática, é uma doença caracterizada por febre, associada ou não a calafrios, suores intensos, dor de cabeça e dores no corpo. A febre acontece no momento em que ocorre o rompimento das hemácias infectadas, liberando merozoítos, que são capazes de infectar outras hemácias (MUNGKALASUT *et al.*, 2022). A febre pode ser classificada em terçã, em que os ciclos de mudança de temperatura corporal se alternam em 48 horas, ou quartã, quando os ciclos de

mudança de temperatura corporal se alternam a cada 72 horas. Essa variação acontece de acordo com a espécie de protozoário que está presente no hospedeiro intermediário (HANBOONKUNUPAKARN *et al.*, 2022; WHITE, 2022).

Outros sintomas clínicos estão frequentemente presentes no desenvolvimento da infecção grave, dos quais pode-se ressaltar a diarreia, alterações de consciência, cianose, icterícia, dor abdominal intensa, falta de ar, mucosas hipocoradas, vômitos, convulsão e aumento significativo no peso do fígado e do baço. Nas análises laboratoriais, normalmente são detectadas hipoglicemia, acidose metabólica, anemia grave, insuficiência renal, hiperparasitemia e hiperlactatemia (WILAIRATANA *et al.*, 2021).

Apesar da possibilidade do desenvolvimento de quadros graves, existem tratamentos eficazes para o combate da malária (WARD *et al.*, 2022). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda esquemas de tratamento de acordo com a espécie de protozoário que está causando a infecção. Os fármacos comumente prescritos são cloroquina, primaquina, lumefantrina, mefloquina, artesunato e artêmete (SAÚDE, 2020). As combinações terapêuticas têm por objetivo eliminar as formas sanguíneas, formas hepáticas e prevenir a recrudescência (que é quando ainda há formas do protozoário infectando hemácias, mas não foi possível detectar ao término da terapia medicamentosa) e recaída (quando o protozoário fica dormente no fígado em forma de hipnozoíta) (FERREIRA *et al.*, 2016; HANBOONKUNUPAKARN *et al.*, 2022).

Os sintomas clínicos, os sinais da infecção e o tratamento para a doença apresentam variação de acordo com a espécie de *Plasmodium sp.* que está causando a doença, existindo a possibilidade de infecções mistas e reinfecção em áreas de risco e endêmicas.

2.1.1 Principais espécies que causam malária em mamíferos

Os protozoários do gênero *Plasmodium sp.* infectam diversas espécies de animais pertencentes ao subfilo *vertebrata*, como aves, répteis e mamíferos (FERREIRA *et al.*, 2020; SIAO *et al.*, 2020). Em roedores, há possibilidade de infecção natural causada por *Plasmodium bergeri*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium chabaudi* (PATTARADILOKRAT *et al.*, 2022). A infecção por cepas de

Plasmodium bergeri, *Plasmodium yoelii* e *Plasmodium chabaudi* são comumente utilizadas em laboratório para o desenvolvimento de modelos experimentais para os estudos relacionados à malária (CRAIG *et al.*, 2012). Em primatas não humanos, normalmente, há populações que são infectadas por *Plasmodium simium*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium brasilianum*, *Plasmodium eylesi*, *Plasmodium inui*, *Plasmodium schwetzi* e *Plasmodium knowlesi*, sendo que três espécies já foram encontradas em humanos, caracterizando uma zoonose (BARBER *et al.*, 2021; RIBEIRO DE CASTRO DUARTE *et al.*, 2021; SAM *et al.*, 2022). Em seres humanos, a malária acontece por infecção pelo *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knwolesi*, sendo esta última espécie a mais recente e é transmitida acidentalmente ou por infecção zoonótica (BARBER *et al.*, 2021; SATO, 2021).

As espécies mais comuns de causarem infecção humana são *Plasmodium vivax*, geralmente associada a malária mais branda e sem complicações, e *Plasmodium falciparum*, que caso não seja diagnosticada e tratada em tempo hábil, pode progredir para a forma grave da doença (ROGERSON *et al.*, 2004). Tanto o *Plasmodium vivax* quanto o *Plasmodium falciparum* são espécies encontradas nos principais países do mundo que ainda apresentam características de serem regiões endêmicas e de risco para o desenvolvimento da malária. Estima-se que 95% das infecções em seres humanos sejam causadas por ambas espécies de *Plasmodium* (PRICE *et al.*, 2020).

2.2 Epidemiologia

2.2.1 Dados epidemiológicos mundiais

De acordo com a OMS, só no ano de 2020 ocorreram em torno de 241 milhões de casos estimados de malária no mundo, atingindo 85 países endêmicos. A maioria dos casos eram causados pelo *Plasmodium falciparum*, seguido do *Plasmodium vivax* (WHO, 2021). Esse número estimado de casos em 2020 representa um aumento de aproximadamente 10% se comparado ao ano de 2019. A malária, em 2020, causou cerca de 627 mil mortes (**Fig. 2**), sendo que 77% foram crianças com idade abaixo de

5 anos de idade. Ressalta-se que a doença é também um grande risco para mulheres grávidas e puérperas (WHO, 2021).

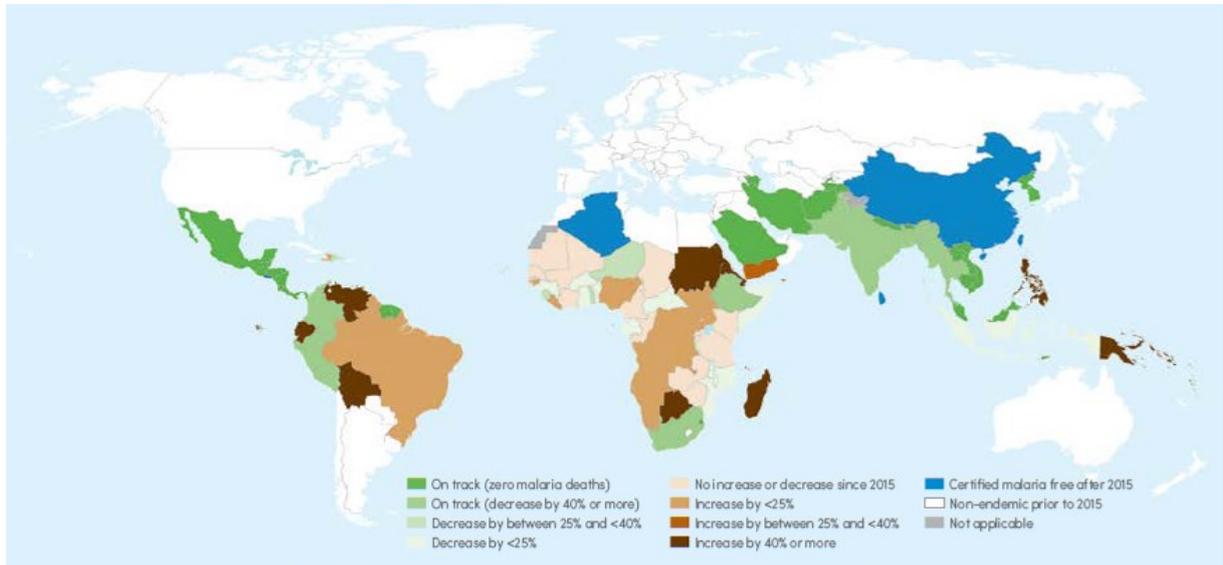


Figura 2: Países endêmicos para malária. Mapa da mortalidade por malária no ano de 2020 e comparação com ano de 2015 (WHO, 2021).

De acordo com o relatório da OMS, só no ano de 2020 houve uma incidência de 59 casos de malária para cada 1000 habitantes de áreas de ricos (**Fig. 3**). 96% dos casos de malária se concentram em 29 países, desses, seis países do continente africano são responsáveis por 55% dos casos (ALEGANA *et al.*, 2021; HEUSCHEN *et al.*, 2021; WHO, 2021). O continente asiático foi responsável por 2% do número de casos do ano de 2020, sendo a Índia país responsável por 83% dos casos de malária no continente (WHO, 2021). No continente americano, em 2020, foram cerca de 650 mil casos de malária, que se distribuem em países da América Central e do Sul. A maioria dos indivíduos infectados pelo protozoário habita na América do Sul. A Venezuela foi o país responsável por mais de 460 mil casos só no ano de 2020. Juntos, República Bolivariana da Venezuela, Colômbia e Brasil representam 77% dos casos de malária que ocorreram na América (HOTEZ *et al.*, 2020; WHO, 2021).

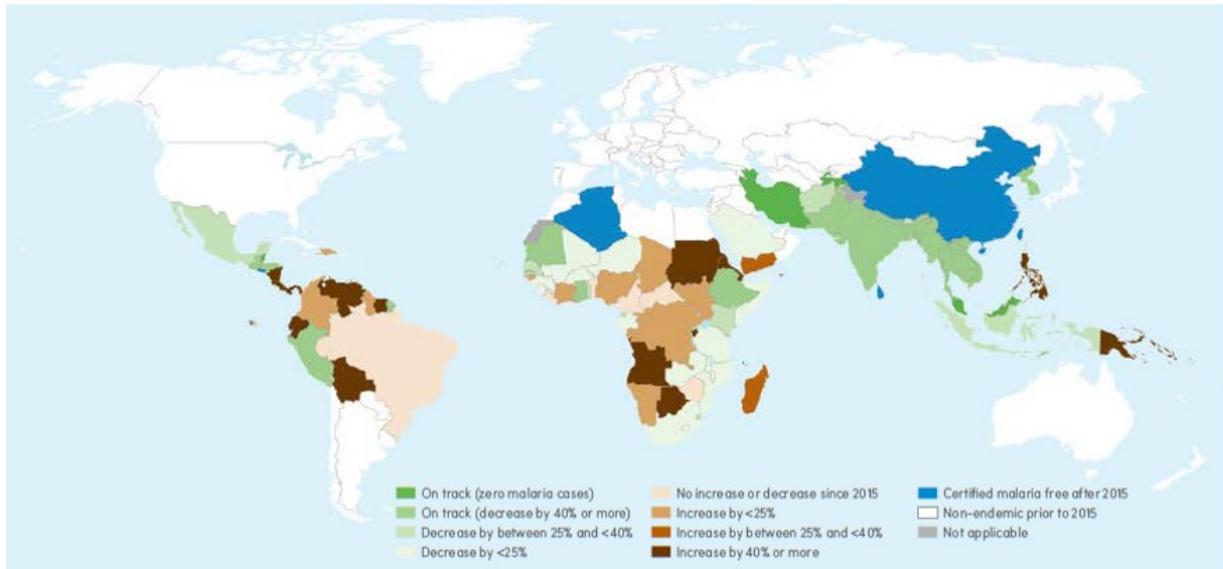


Figura 3: Países endêmicos para malária. Mapa da incidência da malária no ano de 2020 e comparação com ano de 2015 (WHO, 2021).

2.2.2 Dados epidemiológicos no Brasil

Centro-Oeste do país apresentam municípios considerados áreas endêmicas e de risco para a malária (**Fig. 4**) (SAÚDE, M. D., 2021b). De acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, cerca de 44 pessoas morreram de malária no Brasil, sendo 8 casos causados por *Plasmodium falciparum* (SAÚDE, S. D. V. E., 2021).

Os casos de malária se concentram principalmente nos estados da Região Norte do país. Os casos estão mais presentes nos estados do Amazonas, Pará, Roraima e Rondônia, principalmente em áreas rurais e áreas indígenas nesses estados (SAÚDE, M. D., 2021a).

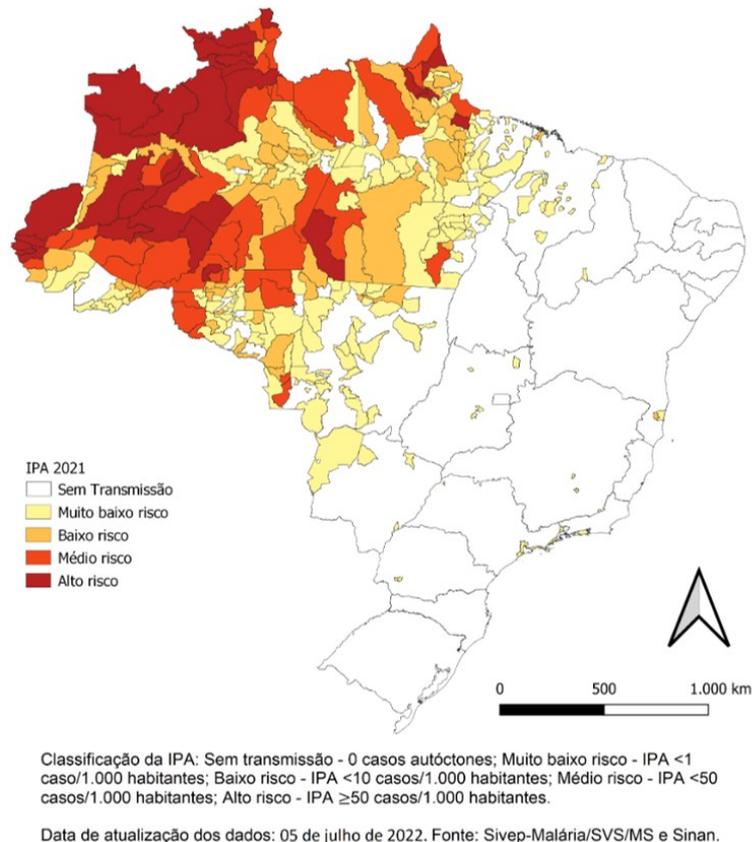


Figura 4: Áreas de risco para malária. Mapa de risco por município de infecção no ano de 2021 (SAÚDE, M. D., 2021b).

Só no ano de 2021 ocorreram mais de 70 mil casos da doença, sendo em torno de 83% dos casos causados por infecção causada por *Plasmodium vivax*, 14,5% por infecção por *Plasmodium falciparum* e uma pequena porcentagem de indivíduos que tiveram infecção mista, ou seja, por duas espécies do protozoário (**Tabela 1**) (CGPNM/DEVIT/SVS/MS, 2022). O Ministério da Saúde possui uma meta de reduzir em até 63% os casos autóctones de malária no país até o ano de 2025. Esta meta foi criada de acordo com os objetivos da OMS para erradicação da doença em áreas endêmicas (SAÚDE, M. D., 2021a).

Tabela 1. Número total de casos de malária por estado brasileiro. Casos totais de malária no Brasil no ano de 2021 (SAÚDE, M. D., 2021a).

Região	UF da infecção	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Malária mista	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	Total geral
Região Amazônica	AC	3.777	468	17			4.262
	AM	25.801	4.658	261	4		30.724
	AP	1.078	114	2			1.194
	MA	48	2	1			51
	MT	1.080	22	8			1.110
	PA	9.899	749	112	1		10.761
	RO	6.922	237	76			7.235
	RR	9.946	3.907	805		1	14.659
	TO	2	1	0			3
Região Extra- Amazônica	CE	1					1
	DF						
	MG	4					4
	MS	1					1
	PE	1					1
	PI	4	1	1			6
	PR	2	1				3
	RJ	3	2				5
	SC	1					1
SP	6					6	
Importado de outro país	Importados	1.083	252	47	2	2	1.386
Total geral		59.659	10.415	1.330	7	3	71.414

2.3 Fisiopatologia da malária

2.3.1 Malária grave

A forma grave da malária, ou também conhecida como terçã maligna, foi descrita antes mesmo da descoberta do protozoário feita por Laveran em 1880 (BRUCE-CHWATT, 1981). O desenvolvimento de um quadro grave em decorrência da infecção por *Plasmodium* depende muito da infecção, dos hospedeiro, das circunstâncias e da conduta terapêutico (WHITE, 2022). Estima-se que 1% do total de casos de malária possam evoluir para gravidade, a maior parte desses casos acontecem em crianças, sendo que os casos graves são causados por *Plasmodium falciparum* (BREJT *et al.*, 2019).

A malária grave é caracterizada por anemia hemolítica grave, em que ocorre destruição de 2% a 25% das hemácias circulantes, possível presença de danos cerebrais, disfunção hepática, disfunção renal, edema pulmonar, que causa insuficiência respiratória, e falência múltipla de órgãos (CRAIG *et al.*, 2012; WHITE,

2022). Uma das hipóteses para o desenvolvimento da malária grave é o sequestro de eritrócitos parasitados para a microvasculatura em pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* e em raros casos por *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium knowlesi* (CRAIG *et al.*, 2012; STORM *et al.*, 2019).

Para escapar da resposta imunológica do hospedeiro, o *Plasmodium falciparum* é responsável pelo sequestro de eritrócitos para microvasculatura de tecidos como intestino, cérebro, pulmão, pele, coração e outros órgãos. O sequestro das hemácias infectadas impede o *clearance* dessas hemácias pelo baço, contribuindo para a sobrevivência do protozoário no hospedeiro, além disso há formação de agregados celulares na parede dos microvasos e aumento da expressão de moléculas de adesão, induzidas também pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias (**Fig. 5**) (BERNABEU *et al.*, 2017; EL-ASWAD *et al.*, 2019).

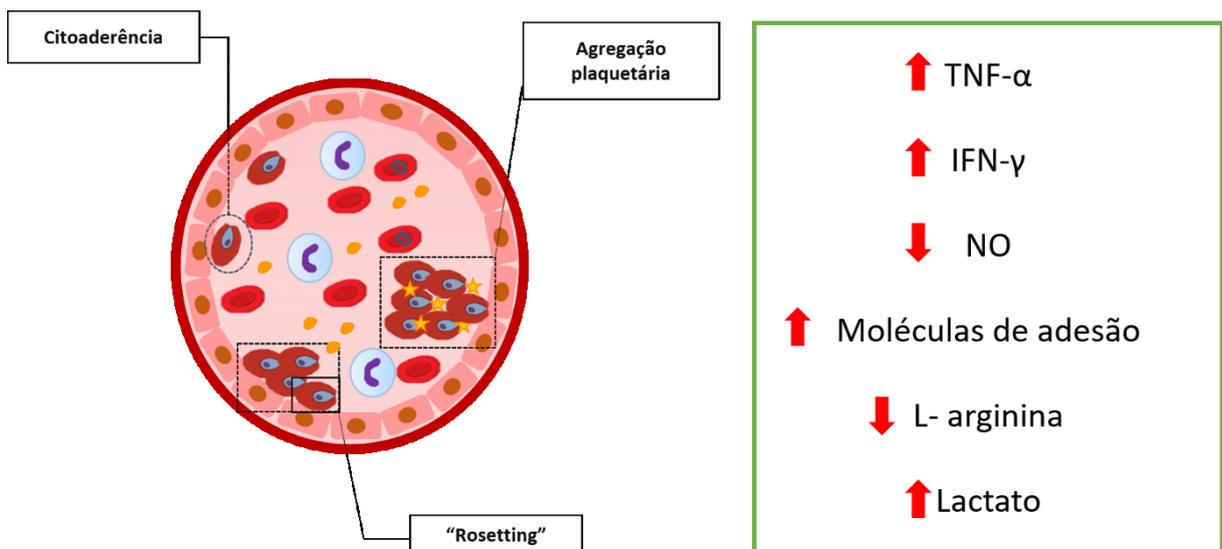


Figura 5: Malária grave. Lesão em microvasos e citoadesância de agregados celulares que desencadeiam as principais alterações inflamatórias causadas pela doença.

Os protozoários têm a capacidade de invadir eritrócitos e fazer com que essas células façam uma adesão eficiente a receptores presentes na vasculatura do hospedeiro, causando oclusão vascular e distúrbios circulatórios locais (STORM *et al.*, 2019). Tais eventos desencadeiam obstrução da microcirculação, principalmente no cérebro e inflamação. O processo inflamatório contribui para a disfunção endotelial em vasos sanguíneos de órgão como coração, fígado, pulmões, baço e cérebro (JENSEN *et al.*, 2020; MISHRA *et al.*, 2013; YEO *et al.*, 2007).

Por muitos anos, os principais estudos descreviam que as alterações mais relevantes na malária grave aconteciam na microcirculação cerebral e que tais mudanças fisiopatológicas neste órgão poderiam desencadear quadros convulsivos, coma e elevada taxa de mortalidade em pacientes que desenvolviam a doença. Raros trabalhos tentaram entender como a infecção afeta outros órgãos, como o coração (GUPTA *et al.*, 2021).

Apesar de serem raras, complicações cardiovasculares foram associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade pela malária grave não tratada (ALENCAR FILHO *et al.*, 2014; COLOMBA *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2021). O envolvimento do sistema cardiovascular durante a malária grave é negligenciado e há poucas pesquisas clínicas e experimentais sobre as consequências da infecção sobre a função vascular e cardíaca.

2.3.2 Alterações cardíacas durante a malária grave

Há relatos da literatura que indivíduos com malária grave apresentam alterações vasculares e cardíacas, que contribuem para o agravamento do quadro clínico (TAYLOR *et al.*, 2004; TURNER *et al.*, 1994). Estudos clínicos e experimentais demonstraram que a infecção causada por determinadas espécies de *Plasmodium* é acompanhada por obstrução da microvasculatura coronariana, lesão no miocárdio, redução da pré-carga e diminuição da função cardíaca, arritmias, taquicardia, redução do débito cardíaco, miocardite e hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo. Estas alterações seriam causadas principalmente pela liberação de proteínas antigênicas, como o glicosilfosfatidilinositol, aumento de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferon-gamma (IFN- γ), e diminuição de óxido nítrico (NO) (**Fig.5 – item 2.3.1**) (COLOMBA *et al.*, 2017; HOLM *et al.*, 2021; MISHRA *et al.*, 2013; VUONG *et al.*, 1999; WENNICKE *et al.*, 2008).

Em pacientes infectados com *Plasmodium vivax*, espécie em que são relatadas raras complicações, já foram demonstradas alterações sutis na função cardíaca. Estes pacientes no primeiro dia de admissão no serviço de saúde apresentam aumento moderado da frequência cardíaca, sem caracterizar taquicardia, e redução da fração de ejeção. Quanto aos achados laboratoriais, havia aumento de peptídeo natriurético (BNP) e troponina I, que são marcadores de insulto cardíaco, e de nitrito e molécula I

de adesão de célula vascular (sVCAM), que são marcadores de inflamação (ALENCAR-FILHO *et al.*, 2016). Todas as alterações cardíacas se mostraram reversíveis após sete dias de tratamento com anti-malárico (ALENCAR-FILHO *et al.*, 2016).

Em um estudo coorte em pacientes internados ao longo de 3 anos, demonstrou-se que indivíduos infectados com malária têm chances maiores de sofrerem infarto agudo do miocárdio se comparado àqueles hospitalizados por outros motivos (JAIN *et al.*, 2010). O *Plasmodium falciparum* foi o agente etiológico prevalente nos pacientes que sofreram infarto, demonstrando a associação entre a malária grave e a ocorrência de eventos isquêmicos cardíacos (JAIN *et al.*, 2010).

As alterações funcionais cardíacas durante a malária grave e, principalmente, seus mecanismos, até o momento ainda permanecem pouco elucidadas. O que se sabe é que existem modificações de função cardíaca e que a presença delas é um fator que contribui para morbidade e mortalidade de pacientes infectados principalmente pelo *Plasmodium falciparum* (HOLM *et al.*, 2021).

2.4 Controle fisiológico e fisiopatológico da função cardíaca

2.4. 1 Contratilidade cardíaca: mecanismo de excitação – contração

Para melhor entendimento de como a malária promove alterações cardíacas, é necessária a compreensão do controle fisiológico da função cardíaca. A contração muscular cardíaca, do ponto de vista morfológico, ocorre o encurtamento dos sarcômeros, ou seja, os filamentos finos, compostos por actina, tropomiosina, troponinas e nebulina, deslizam sobre os filamentos grossos, compostos por miosina. Isto posto, há aproximação das linhas Z, diminuição da banda I, diminuição da banda H e manutenção da banda A (**Fig. 6**) (AIRES, 2018).

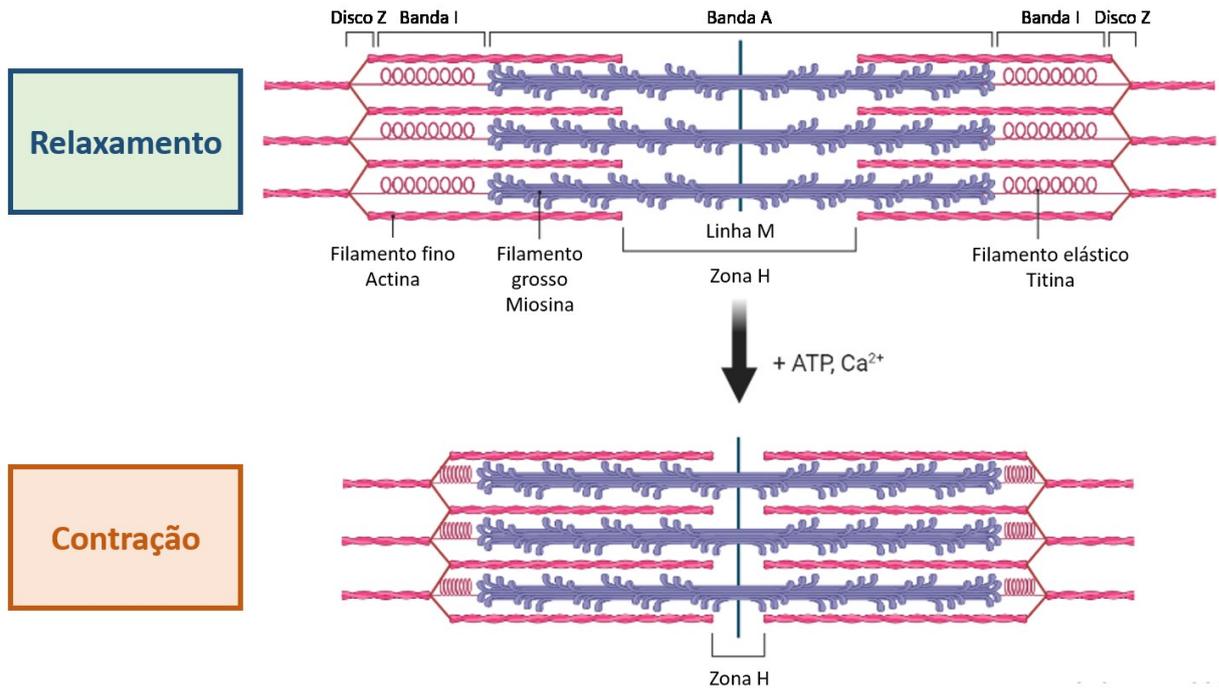


Figura 6: Proteínas contráteis no cardiomiócito. Movimento das proteínas contráteis no relaxamento e contração do músculo cardíaco.

Os mecanismos desencadeados por potenciais de ação que irão causar contração das células musculares cardíacas são denominados de acoplamento excitação-contração. Os cardiomiócitos, em resposta a uma corrente elétrica gerada nas células auto-excitáveis cardíacas, ficam mais permeáveis aos íons sódio (Na^+), promovendo o início da despolarização, quando o potencial de membrana atinge valores de -55 a -35 mV. Com isso, há aumento da condutância ao íon cálcio (Ca^{2+}), que influi lentamente mantendo a célula despolarizada por mais tempo (platô). O início da contração do cardiomiócito se dá pela entrada de Ca^{2+} do meio extracelular pelos canais para Ca^{2+} do tipo L, que são dependentes de voltagem. O Ca^{2+} no meio intracelular irá sensibilizar os receptores de rianodina (RyR2) e isso desencadeará a liberação do Ca^{2+} que fica estocado no retículo sarcoplasmático. Após aumento de concentração do Ca^{2+} , o íon se ligará a troponina C, causando alterações conformacionais que permitem a interação dos filamentos finos e grossos que, às custas da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP), promovem a contração do cardiomiócito (AIRES, 2018).

Para que o cardiomiócito volte para o seu estado de repouso (relaxado), o Ca^{2+} é ativamente captado de volta ao retículo sarcoplasmático pela bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA), garantindo que haja Ca^{2+} suficiente para a próxima contração. A atividade da SERCA é inibida por uma proteína chamada fosfolambam (PLB) (**Fig. 7**), que quando fosforilada pela proteína quinase A (PKA), sofre inibição, aumentando a captação de Ca^{2+} pela SERCA. A rápida extrusão de Na^+ , através da bomba de Na^+ e potássio (K^+), gera o gradiente eletroquímico que faz com que um trocador de Ca^{2+} e Na^+ (NCX), que está presente na membrana do cardiomiócito, envie 2 moléculas de Ca^{2+} para o meio extracelular e faz o influxo de 3 moléculas de Na^+ (**Fig. 7**) (AIRES, 2018). Com a dissociação do Ca^{2+} da troponina, as proteínas da contração não interagem, favorecendo o alongamento do sarcômero (relaxamento).

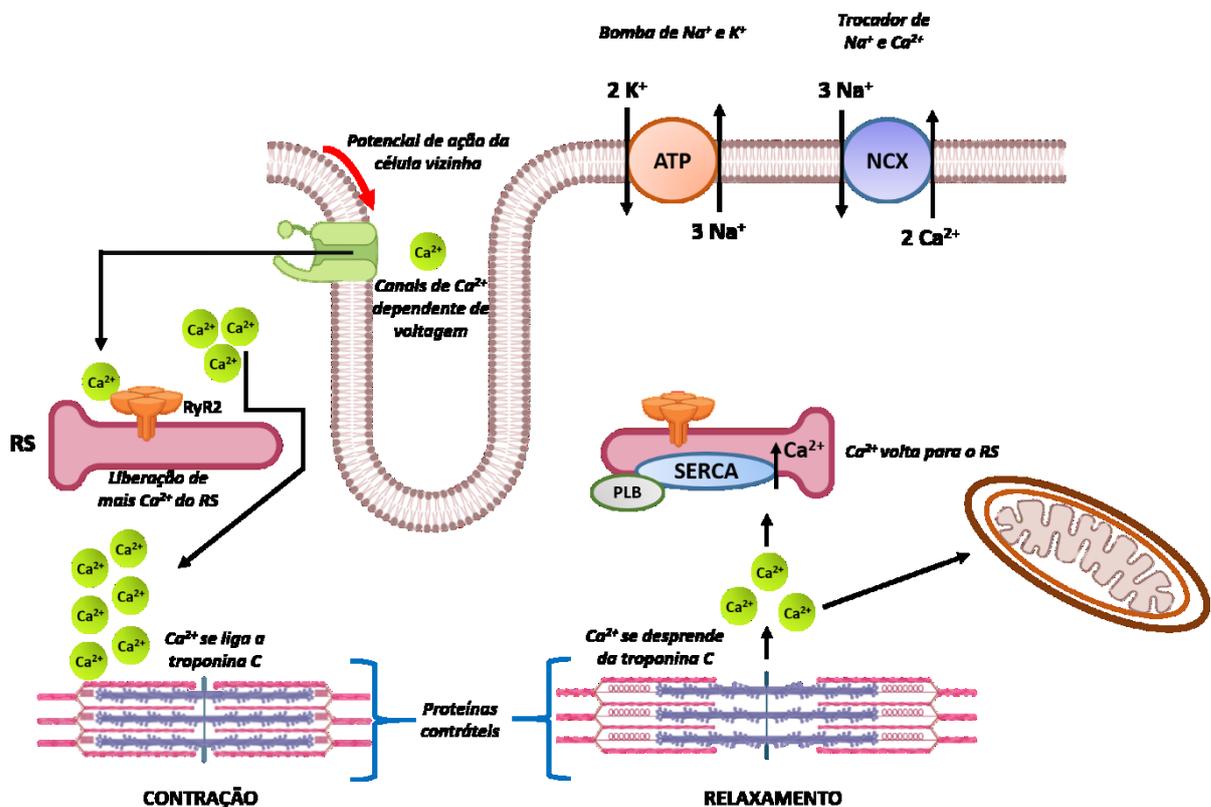


Figura 7: Acoplamento excitação-contracção no cardiomiócito. Mecanismo de contração e relaxamento do cardiomiócito a partir da entrada de cálcio (Ca^{2+}) por canais para Ca^{2+} voltagem-dependentes. Em seguida, o Ca^{2+} se liga aos canais de Rianodina (RyR2) liberando mais Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS). O Ca^{2+} se liga à troponina C fazendo com que ocorra o deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos, promovendo contração. Para o relaxamento, o Ca^{2+} volta para o RS, via captação pela bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA), e volta para o meio extracelular pelo trocador de Ca^{2+} e Na^+ (NCX). Parte do Ca^{2+} também é captada pela mitocôndria.

A contração cardíaca é afetada por fatores fisiológicos, como o sistema nervoso autônomo, a pré-carga cardíaca (estiramento dos cardiomiócitos) e alterações no padrão de fosforilação das proteínas contráteis, e por fatores patológicos, como a isquemia tecidual (AIRES, 2018).

2.4.3 Contratilidade cardíaca: lei de Frank-Starling

O coração tem a capacidade de regular o débito cardíaco, ou seja, o volume de sangue ejetado por minuto, de acordo com a necessidade do organismo. Para isso, o músculo cardíaco deve ser capaz de modificar seu estado contrátil para suprir a demanda de tecidos periféricos (AIRES, 2018). O débito cardíaco por ser influenciado por fatores intrínsecos que irão determinar o desempenho do coração, que pode ser por autorregulação através do mecanismo de Frank-Starling (SEQUEIRA *et al.*, 2017). Isso significa que o coração é capaz de desenvolver tensão na proporção demandada pelo contexto fisiológico ou fisiopatológico (KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA *et al.*, 2014).

A contração é aumentada por alongamento do sarcômero em resposta ao aumento do retorno venoso (pré-carga) para o coração (KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA *et al.*, 2014). Esse mecanismo é considerado uma forma de adaptação funcional a curto prazo para atender uma demanda periférica aumentada de sangue. O estiramento do sarcômero, de alguma forma, aumenta a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} (SEQUEIRA *et al.*, 2017). A relação positiva entre volume sistólico (ejetado) em função da pressão de enchimento ventricular pode ser modulada para mais ou para menos. Por exemplo, uma maior resposta contrátil ao aumento de pré-carga é observada em indivíduos treinados (fisiológica) e em estágios iniciais da cardiomiopatia (fisiopatológica). Por outro lado, com a degeneração progressiva dos miócitos e a sobrecarga de volume, haverá perda e estiramento das fibras, levando ao desenvolvimento de insuficiência sistólica.

2.4. 3 Contratilidade cardíaca: controle autônomo

O acoplamento excitação-contração é influenciado por transmissores liberados através da atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) (WEIL *et al.*, 2019).

Para que o SNA exerça a sua função, as células pós-sinápticas possuem receptores, para acetilcolina, muscarínicos (M1 a M5) ou nicotínicos (N_N), e para catecolaminas, receptores alfa (α 1 e α 2) e receptores beta (β 1, β 2 e β 3) (ANDEN, 1980; KATZUNG, 2014).

A função cardíaca é controlada pelo SNA simpático e parassimpático. O sistema nervoso parassimpático atua diretamente sobre o nodo sinoatrial, onde irá promover a redução da frequência cardíaca mediada por receptores M2, que são acoplados à proteína G inibitória (G_i). De forma indireta, nas células presentes nos ventrículos cardíacos, o receptor M2 têm efeito inibitório sobre a contratilidade ventricular gerada pela ativação de receptores β -adrenérgicos (DYAVANAPALLI, 2020; HARVEY, 2012). O SNA simpático atua no coração através da inervação adrenérgica sobre o nodo sinoatrial e nas células musculares cardíacas. No tecido cardíaco, por exemplo, há presença de receptores α 1, β 1 e β 2 adrenérgicos, sendo os receptores β os mais abundantes e, por isso, os responsáveis por mediar o aumento na força e frequência cardíacas. Esses receptores estão distribuídos pelos átrios e pelos ventrículos, com predominância do receptor β 1 (BRODDE *et al.*, 2001; DYAVANAPALLI, 2020).

Os receptores β são acoplados à proteína G estimulatória (G_s) (**Fig. 8**). Quando há ligação de um agonista ao receptor, a proteína G_s promove ativação da adenilato ciclase. A adenilato ciclase irá catalisar a conversão de ATP em monofosfato cíclico de Adenosina (AMPc), que atuará como segundo mensageiro. O aumento das concentrações de AMPc no meio intracelular ativará proteína quinase A (PKA), que fosforila canais para Ca²⁺ do tipo L acarretando o aumento do influxo de Ca²⁺, e RyR2, aumentando a saída do Ca²⁺ estocado. Estes efeitos culminam em aumento da contratilidade (resposta inotrópica positiva). A PKA também irá fosforilar PLB em um sítio inibitório, promovendo a recaptção rápida de Ca²⁺ através da SERCA, aumento a velocidade relaxamento (efeito lusitrópico positivo) (**Fig. 8**) (BRODDE *et al.*, 2001; FAJARDO *et al.*, 2013; KEMI *et al.*, 2007).

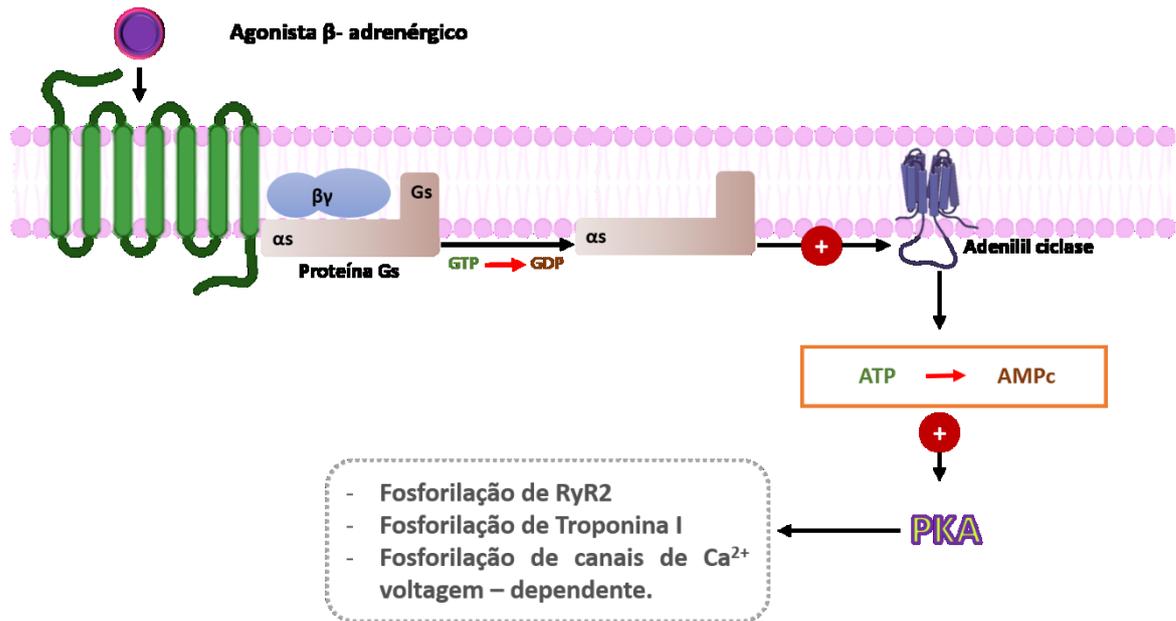


Figura 8: Sinalização β -adrenérgica. Mecanismo de ação intracelular de agonista β -adrenérgico no cardiomiócito (KATZUNG, 2014).

Do ponto de vista farmacológico, os agonistas de receptores β -adrenérgicos como a isoprenalina ou isoproterenol (agonista não seletivo de receptores β -adrenérgicos) mimetizam a ação autonômica simpática sobre o coração e demais órgãos em que os efeitos sejam mediados por estes receptores. Estes fármacos são usados clinicamente e na experimentação animal como estressores cardíacos para identificar possíveis alterações do acoplamento excitação-contração que não estejam evidentes no repouso (ANDEN, 1980; KATZUNG, 2014).

O óxido nítrico (NO) é um mediador endógeno que modula a resposta β -adrenérgica de forma bimodal. Ou seja, pequenas quantidades de NO contribuem para a resposta inotrópica positiva no coração e altas concentrações de NO causam efeito negativo sobre a força de contração induzida por agonista adrenérgico (MASSION *et al.*, 2003).

O NO é produzido por meio da ação enzimática da óxido nítrico sintase (NOS) sobre o aminoácido L-arginina. Existem três isoformas da enzima: a neuronal (nNOS), induzida (iNOS) e endotelial (eNOS). No coração, em condições fisiológicas, as isoformas nNOS e eNOS exercem papel importante na regulação da contração e frequência cardíaca. A nNOS no cardiomiócito está co-localizada com RyR2 no

retículo sarcoplasmático e medeia a liberação de Ca^{2+} , promovendo a contração (BAROUCH *et al.*, 2002; KULANDAVELU *et al.*, 2012). Já a eNOS está localizada no sarcolema, compartimentalizada em um cavéola juntamente com canais do tipo L voltagem-dependentes e receptores β_1 , β_2 e β_3 -adrenérgicos; a produção de NO mediada pela eNOS via receptor β_3 tem uma ação fisiológica inibitória sobre o inotropismo (BAROUCH *et al.*, 2002).

Em condições de hipertrofia e insuficiência cardíaca, a via de sinalização receptor β_3 /nNOS/NO tem função cardioprotetora (NIU *et al.*, 2012). Porém, em condições fisiopatológicas similares, ocorre o desacoplamento da eNOS, que produz ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) em vez de NO quando o receptor β_3 adrenérgico é ativado. Com isso, há redução na biodisponibilidade de NO e aumento do estresse oxidativo, causando a apoptose de cardiomiócitos, alterações morfológicas, funcionais e distúrbios de contratilidade cardíaca (TEUBER *et al.*, 2022).

Além do desacoplamento da NOS como fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO), há outras enzimas pró-oxidantes que também têm participação crucial para o desenvolvimento de disfunção cardíaca, como a enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase.

2.5 Mecanismos moleculares e de estresse oxidativo envolvidos em doenças cardíacas

A maior parte dos estudos sobre as alterações cardiovasculares durante a malária são relatos de caso ou estudos clínicos com poucos pacientes (GUPTA *et al.*, 2021; MISHRA *et al.*, 2013). Portanto, dados sobre a repercussão cardíaca da doença permanecem escassos.

Algumas revisões de literatura sugerem que alterações cardíacas acontecem devido ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando, desta forma, disfunção contrátil, e pela presença de toxinas produzidas pelo protozoário, que causariam estresse oxidativo e a apoptose de cardiomiócitos (DAY *et al.*, 1999; MARRELLI *et al.*, 2016). O estresse oxidativo tem um papel importante no desenvolvimento dos principais sinais da malária. Estudos demonstraram que, na malária causada por *Plasmodium falciparum*, os eritrócitos infectados liberam mais

EROs se comparados aos de pacientes infectados com a espécie do protozoário que causa uma malária mais branda (PRASANNACHANDRA, 2006).

As enzimas da família nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase, NOX ou DUOX) constituem as principais fontes de EROs no sistema cardiovascular. Esta enzima está localizada em diversos tipos celulares, como células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, células musculares lisas e cardiomiócitos (VERMOT *et al.*, 2021). Existem sete isoformas da enzima, que são denominadas NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DOUX1 e DUOX2 (TEUBER *et al.*, 2022). As isoformas NOX compartilham uma homologia estrutural, onde há a subunidade catalítica, que é uma proteína transmembrana em hélice, que possui um grupo prostético heme e um domínio com uma enzima dehidrogenase. Essas enzimas terão variações em relação aos co-fatores enzimáticos de acordo com os tipos celulares e mecanismos de ativação (Fig. 9) (PANDAY *et al.*, 2015; VERMOT *et al.*, 2021).

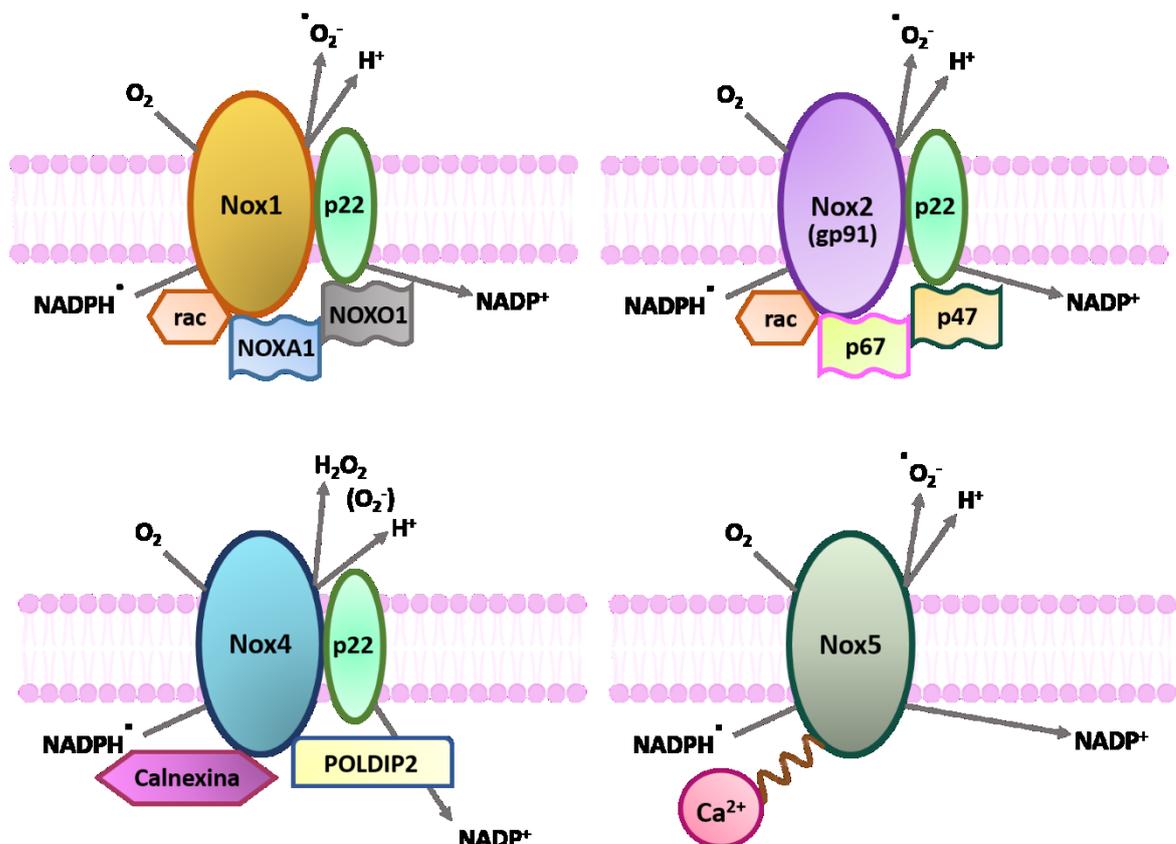


Figura 9: Isoformas de NADPH oxidase. As isoformas NOX1, NOX2 e NOX5 produzem ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), enquanto a Nox4 produz principalmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A atividade de NOX5 é dependente de cálcio (Ca^{2+}) (FUKAI *et al.*, 2020; PANDAY *et al.*, 2015).

Em situações fisiológicas, a NOX tem como função principal a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($\cdot O_2^-$) a partir da ação catalítica sobre o oxigênio (O_2). Em contexto em que há homeostasia, existem enzimas de sistemas antioxidantes, que possuem capacidade de eliminar de forma eficiente as EROs produzidas pela NOX. Porém, em condições patológicas, ocorre o aumento da expressão de NOX, levando a aumento de $\cdot O_2^-$ e, concomitantemente, os sistemas antioxidantes não são capazes de eliminar EROs de forma eficiente, causando alterações celulares significativas (TAYLOR *et al.*, 2021; VERMOT *et al.*, 2021)

Nos cardiomiócitos, são expressas as enzimas NOX2, NOX4 e NOX5. Porém, as NOX2 e NOX4 são as isoformas mais descritas em células musculares cardíacas. A NOX4 tem atividade constitutiva, mas também pode ser regulada de acordo com diferentes condições que alterem a homeostasia do cardiomiócito. Esta isoforma fica localizada no meio intracelular, mais precisamente em membranas de organelas, como o retículo sarcoplasmático, envelope nuclear e mitocôndria (MATSUSHIMA *et al.*, 2013; MATSUSHIMA *et al.*, 2016; SCIARRETTA *et al.*, 2013; TEUBER *et al.*, 2022). A NOX2 tem atividade induzida pela presença de mediadores que alteram o tônus vascular. Esta isoforma está localizada principalmente na membrana celular em diferentes microdomínios, como túbulos T, membrana lateral e nos discos intercalares dos cardiomiócitos (TEUBER *et al.*, 2022; ZHANG, M. *et al.*, 2015).

A principal função desta enzima é produzir $\cdot O_2^-$. Níveis baixos de EROs são fisiologicamente necessários, porém, quando há excesso na produção, EROs contribuem para o prejuízo da função cardiovascular (ZHANG, L. *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2020). A NOX está associada à elevada produção de EROs no coração durante quadros de arritmia, em modelo de aumento de sobrecarga de pressão por constrição aórtica ou após infusão de fenilefrina ou angiotensina-II (AGO *et al.*, 2010). O aumento da atividade na NOX e, conseqüentemente, de $\cdot O_2^-$, leva à apoptose de cardiomiócitos e disfunção cardíaca (**Fig. 10**) (AGO *et al.*, 2010; YOUN *et al.*, 2013).

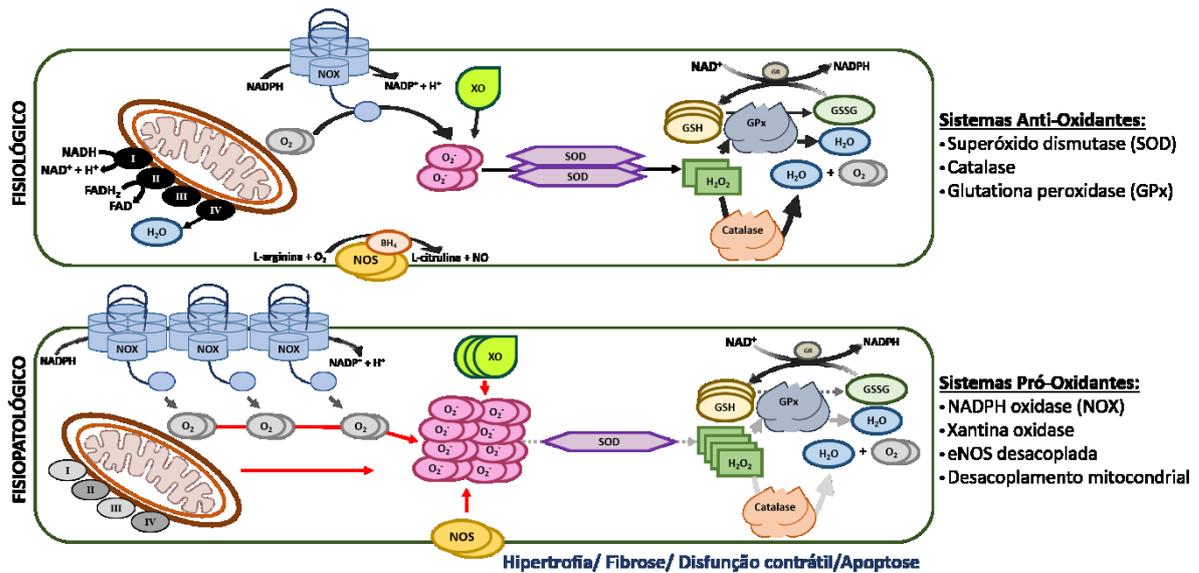


Figura 10: Sistema pró-oxidantes e antioxidantes em cardiomiócitos. Estresse oxidativo em condições fisiológicas e o equilíbrio entre sistemas pró-oxidantes e antioxidantes (superior). Estresse oxidativo em condições fisiopatológicas e o desequilíbrio entre sistemas pró-oxidantes e antioxidantes (VAN DER POL *et al.*, 2019).

Durante a malária, há um desequilíbrio entre enzimas oxidantes e sistemas antioxidantes, gerando, assim, o estresse oxidativo. Estudos demonstraram que o aumento de marcadores de estresse oxidativos está correlacionado à gravidade da doença (GOYAL *et al.*, 2012; PERCARIO *et al.*, 2012). Além da produção de EROs por células do sistema imune, o protozoário, ao destruir o eritrócito, libera a hemoglobina, e quando esta proteína é degradada, resulta em intenso estresse oxidativo (NARSARIA *et al.*, 2012; RIFKIND *et al.*, 2014). Há aumento da produção de EROs como $\cdot\text{O}_2^-$ em crianças com malária grave (NARSARIA *et al.*, 2012) e em modelo murino de malária cerebral (FRANCISCHETTI *et al.*, 2014).

Na literatura, há trabalhos que descrevem danos graves à função cardíaca durante a malária grave. Porém, os mecanismos pelos quais há o desenvolvimento de alterações funcionais cardíacas ainda não foram elucidados. Há estudos que indicam que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos que irão desencadear danos a órgãos em indivíduos com malária. Uma das principais enzimas envolvidas na produção de EROs é a NOX, mais especificamente a NOX2, que está presente em diversos tipos celulares no coração. Portanto, torna-se importante investigar a participação da enzima no desenvolvimento de alterações cardíacas

relevantes durante a malária grave e dados mais robustos relacionados a esse mecanismo poderiam auxiliar em futuras terapias adjuvantes para a malária grave.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a participação da enzima NADPH oxidase no desenvolvimento de alterações cardíacas em modelo experimental de malária grave (MEMG).

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a função cardíaca e sinais da infecção por malária ao longo do tempo.

- Determinar a participação do estresse oxidativo, mais especificamente da NADPH oxidase, nas alterações cardíacas causadas pela malária grave.

- Avaliar o papel do NO nas alterações de contratilidade cardíaca induzidas pela malária.

- Confirmar a participação da NADPH oxidase 2 nas alterações de contratilidade cardíaca causadas pela malária grave.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Camundongos BALB/c foram mantidos em caixas à temperatura ambiente; água e comida *ad libitum* e ciclo de claro/escuro de 12 horas. O projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob o protocolo 330/2018. A espécie utilizada do protozoário foi o *Plasmodium chabaudi* AS, que infecta apenas roedores, causando uma forma grave de malária (CRAIG *et al.*, 2012; STEPHENS *et al.*, 2012).

Os experimentos foram divididos em três protocolos, listados na **tabela 2**. Os camundongos BALB/c (Tabela 2, protocolos 1 e 2) e os C57BL/6 (Tabela 2, protocolo 3) foram fornecidos pelo Biotério Central da UFMG e mantidos no Biotério do departamento de Farmacologia com água e ração *ad libitum*.

Para avaliar a infecção e observar a fase aguda da infecção, os animais BALB/c foram divididos em 4 grupos experimentais, um controle e três com diferentes tempos de infecção: 7, 14 e 28 dias.

A apocinina é um inibidor de NADPH oxidases. O tratamento com apocinina foi realizado por gavagem diária do 7º ao 14º dia pós-infecção, dpi, na dose de 30 mg/kg (SIMPLICIO *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2015). A escolha do momento do tratamento foi baseada nos resultados do primeiro protocolo experimental.

Os camundongos nocautes para a subunidade gp91^{phox} da isoforma 2 da NADPH oxidase (NOX2) – protocolo 3 – foram gentilmente cedidos pela profa. Dra. Leda Quercia Vieira. Estes animais foram criados no Biotério do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, UFMG (LAGI, ICB – UFMG), e mantidos em microisoladores no Biotério do laboratório de Imunofarmacologia (ICB – UFMG)

Tabela 2. Protocolos e grupos experimentais

Protocolo	Linhagem	Grupos	Objetivo
1	- BALB/c	-Controle	Caracterização temporal da infecção
		- 7 dias de infecção	
		- 14 dias de infecção	
2	- BALB/c	- 28 dias de infecção	Efeitos da inibição de NOX por apocinina (7° ao 14° dia pós-infecção, dpi) – 30 mg/kg por dia (gavagem)
		- Controle veículo	
		- Controle apocinina	
3	- C57BL/6 - NOX2 ^{-/-}	- Infectado veículo	Confirmação da participação da isoforma NOX2 nas alterações de função cardíaca induzidas por malária
		- Infectado apocinina	
		- Controle <i>wild type</i>	
3	- C57BL/6 - NOX2 ^{-/-}	- Infectado <i>wild type</i>	Confirmação da participação da isoforma NOX2 nas alterações de função cardíaca induzidas por malária
		- Controle NOX2 ^{-/-}	
		- Infectado NOX2 ^{-/-}	

4.2 Infecção com *Plasmodium chabaudi*, MEMG grave

Uma amostra da cepa foi descongelada e inoculada em um camundongo para garantir a virulência da cepa. Com parasitemia entre 20-40%, o camundongo doador foi anestesiado com Cetamina (100 mg/kg) associada à Xilazina (10 mg/kg), em seguida, submetido a eutanásia por sangria e o sangue foi coletado com seringa contendo heparina. Após quantificação de hemácias na câmara de Neubauer, a sangue foi diluído com solução tampão fosfato-salino (PBS) a fim de alcançar a concentração desejada de 10⁶ eritrócitos parasitados, em volume final de 200 µL. O inóculo foi injetado por via intraperitoneal.

4.3 Determinação da parasitemia

A parasitemia foi acompanhada diariamente, ao longo de 28 dias, através da técnica da extensão sanguínea de uma amostra do sangue periférico corada pelo método do panótico rápido. O resultado foi expresso em porcentagem de hemácias parasitadas em relação ao total de hemácias. Foram contadas 1000 hemácias

divididas em quatro campos distintos da lâmina. A contagem de eritrócitos parasitados foi feita em um microscópio de luz com objetiva de 100x.

4.4 Avaliação do peso corporal, peso de órgãos-alvo e do coração

O peso dos animais foi monitorado periodicamente até o momento da eutanásia. Para avaliar o peso dos órgãos, os animais foram eutanasiados por sangria sob anestesia geral (Cetamina:Xilazina 100:10 mg/kg, I.P.) e submetidos à laparotomia mediana. O baço, fígado e coração foram retirados, limpos e pesados. O peso de cada órgão foi corrigido pelo comprimento da tíbia. Os tecidos cardíacos foram armazenados em microtubos em freezer a -20° C para as análises bioquímicas e moleculares.

4.5 Hemograma

Os animais foram anestesiados e eutanasiados como descrito no item 4.4, submetidos a laparotomia mediana. Para contagem de hemácias e hematócrito, foram retirados 500 µL de sangue por rompimento da veia cava inferior. Cada amostra foi homogeneizada com 20 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e foi analisada em um hemocítômetro MEK-7300K (Nihon Kohden - CelltacES).

4.6 Avaliação da função cardíaca *ex vivo* – Langendorff

A cavidade torácica dos animais foi aberta após eutanásia. Os corações isolados foram colocados em solução Krebs (em mM): 113 NaCl; 4,7 KCl; 1,1 KH₂PO₄; 1,1 MgCl₂; 22 NaHCO₃; 11 glicose; 1,35 CaCl₂) a 4° C e com pH ajustado para 7,4. A aorta ascendente foi canulada. Os corações foram montados em um banho de órgãos com fluxo de 2,5 mL/min de Krebs a 37° C aerado por mistura carbogênica (5% CO₂ e 95% O₂) (BELL *et al.*, 2011; OLEJNICKOVA *et al.*, 2015). Um balão de látex foi conectado a um transdutor de pressão e a um amplificador (AVS projetos, SP). O balão foi colocado no ventrículo esquerdo e preenchido com água para ajustar a pressão diastólica final a 5 mmHg. A pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) foi calculada pela diferença entre a pressão sistólica e a pressão diastólica.

Após estabilização, foi realizada a curva com isoprenalina (10^{-10} a 10^{-5} mol/L) com intervalos de 50 segundos entre as concentrações. Nos animais do protocolo 2 (tabela 1) também foram realizadas curvas de pressão (pressão diastólica: 5, 10 e 20 mmHg), para avaliar a resposta contrátil ao aumento de pré-carga, e curvas de isoprenalina na presença de *N*-nitro-*L*-arginina–metil éster (L-NAME) a 10^{-4} mol/L, a fim de avaliar a contribuição do NO.

4.7 Avaliação histopatológica do coração

Para retirada do coração os animais foram eutanasiados por sangria sob anestesia geral (Cetamina:Xilazina 100:10 mg/kg, I.P.) e submetidos à laparotomia mediana. Os corações foram fixados em solução de PFA 4% (diluído em PBS 0,1 M) de 24 a 48 horas. Após o tempo de fixação, os corações foram embebidos em álcool 70, 80, 95 e 100% para que os tecidos fossem desidratados. Em seguida, para diafanização, as amostras foram imersas em xilol. Na etapa seguinte os tecidos foram incluídos em parafina. Foram feitas secções de 5 μ m com auxílio de um micrótomo. Os cortes foram posicionados em lâminas de vidro e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina (H&E).

A análise histopatológica foi baseada na intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e da fibrose. O score histopatológico de cada parâmetro variou de 0 a 4, sendo 0 ausente, 1 leve, moderado, 3 intenso e 4 muito intenso. O avaliador realizou a análise cega. O microscópio, a câmera e o programa utilizado para obtenção das imagens são de marca Motic. O aumento utilizado foi de 400x.

4.8 Dosagem de proteínas

Para realização dos ensaios para quantificação de peroxidação lipídica e enzimas antioxidante, foi realizada a normalização pela concentração de proteína de cada amostra. A quantificação de proteínas das amostras foi realizada através do ensaio de Bradford. Após homogeneização das amostras e centrifugação com tampão de lise (item 4.8), 5 μ L do sobrenadante de cada amostra foi colocado em uma placa de 96 poços juntamente com 200 μ L de reagente de Bradford (Bio-Rad). A reação foi

incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, através de detecção colorimétrica, as amostras foram lidas em comprimento de onda de 595 nm. A relação entre a absorbância e concentração de proteína foi avaliada por meio da curva-padrão de soroalbumina bovina (BSA) nas concentrações: 0,0625 mg/dL – 2,0 mg/dL.

4.9 Avaliação da peroxidação lipídica

Amostras do ventrículo esquerdo do coração dos animais experimentais foram homogeneizadas em 350 µL de tampão de lise (1 ml de PBS 10x; 0,1 ml do surfactante NP40; 0,05 g de deoxicolato de sódio; 0,1 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%; água destilada qsp 10 ml; 4 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 5 µL do mix de inibidor de protease). Após homogeneização com o tampão de lise, o homogenato foi centrifugado a 4500 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos a 4°C. Para parte posterior do ensaio foi utilizado o sobrenadante. Foram utilizados 25 µL do sobrenadante, 25 µL de SDS 8,1% e 1 mL de reagente de cor contendo ácido acético, hidróxido de sódio e ácido tiobarbitúrico (TBA). Simultaneamente, foi realizada uma curva-padrão (0,625 – 10 µM) para obter a relação entre a absorbância e concentração de malonaldeído (MDA), principal produto da peroxidação lipídica. As amostras e a curva-padrão foram colocadas em banho seco por 1 hora a 100° C. Durante esta etapa o MDA contido nas amostras e curva-padrão reagiu ao ácido tiobabitúrico. Após esta etapa de incubação as amostras e a curva-padrão foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 8000 rpm. Após centrifugação, 150 µL do sobrenadante foram colocados em placas com 96 poços e por método colorimétrico, com leitura de 540 nm, foi realizada a dosagem de substâncias reativas do TBA (TBARS). Os resultados foram expressos como nmol/mg proteína.

4.10 Detecção de espécies reativas de oxigênio *in situ*

Para investigação da produção de EROs no coração de animais do protocolo 2, foi utilizada a sonda di-hidroetidina (DHE, Sigma Aldrich, D7008). DHE reage com o ânion superóxido e outras EROs, levando à formação de 2-hidroxiéideo e de etídeo, produtos que intercalam ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e emitem fluorescência vermelha no núcleo celular. Inicialmente, coração foi incluído em meio de

congelamento (Tissue-Tek O.C.T. compound – Dajota/Sakura) e armazenado em freezer – 80° C. Foram feitas criosecções com espessura de 10 µm e os cortes foram posicionados em lâminas silanizadas. As secções foram incubados com uma solução permeabilizante de Triton X-100 a 1% em PBS durante 10 minutos. Em seguida, foram incubados com a solução de DHE (10⁻⁴ mol/L) na estufa a 37 °C durante 30 minutos. Após incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS por cinco minutos. Para montagem das lâminas, foi utilizado glicerol 70% diluído em PBS para conservação do tecido e da fluorescência. Através de um microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas no aumento de 200x. As concentrações de EROs encontradas nos tecidos foram vistas por emissão de fluorescência vermelha, e quantificada pelo programa ImageJ (NIH – National Institutes of Health).

4.11 Preparação do tecido e quantificação dos sistemas antioxidantes

Foram coletadas amostras de coração de animais do primeiro e do segundo protocolo experimental. Os animais foram primeiramente anestesiados, foi realizada uma abertura na cavidade torácica. Os corações foram homogeneizados em PBS pH 7,4 e o homogenato foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4° C.

4.11.1 Determinação da atividade tecidual da superóxido dismutase (SOD)

Para o ensaio, foram utilizados 20 µL do sobrenadante. O ensaio utiliza o sal de tetrazólio para a detecção de radicais superóxido gerados pela xantina oxidase e hipoxantina, sendo que a reação gera o produto cromogênico, corante de formazan, com absorvância entre 440-460nm. Uma unidade de SOD (U/ml) é definida como a quantidade de enzima necessária para que ocorra 50% da dismutação do radical superóxido (SIMPLICIO *et al.*, 2015). A fórmula utilizada para a determinação da atividade de SOD está exibida na imagem seguinte (**Cálculo 1**). Na dosagem, é adicionada a amostra uma solução enzimática e para cada amostra há um branco, denominado branco 2, que é constituído pela amostra, mas sem a solução enzimática. Após, há mais dois brancos: o branco 1 contém somente a solução enzimática, o branco 3 sem amostra e nem solução enzimática.

Cálculo 1. Fórmula para determinação da atividade de SOD.

$$\text{Atividade da SOD (taxa de inibição\%)} = \left[\frac{(\text{Abs1} - \text{Abs.Br3}) - (\text{Abs Am.} - \text{Abs Br2})}{(\text{Abs. Br1} - \text{Abs Br3})} \right] \times 100$$

Legenda: Abs= Absorbância, Br=Branco.

Fonte: Superoxide Dismutase Assay Kit, Cayman Chemical Company, EUA, Cat. Nº 706002.

4.11.2 Determinação da atividade tecidual da catalase

O ensaio se deu pela adição de 1 µL do sobrenadante da amostra de tecido a 1699 µL de PBS 1x e 300 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em cubetas de quartzo e, após a homogeneização, verificou-se a velocidade de decomposição do H₂O₂ por 1 minuto. Subtraiu-se o valor inicial de absorbância do valor final obtido e os resultados foram expressos como unidades de catalase por mg proteína (AEBI, 1984).

4.11.3 Quantificação da glutationa reduzida (GSH)

Foi adicionado 100 µL do homogenato a 100 µL de ácido tricloroacético (0,0125%), permanecendo em gelo por 30 minutos e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, adicionou-se 100 µL da amostra, 200 µL de tampão Tris pH 8,0 e 5 µL de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) em placas de 96 poços (DTNB; 3,96 mg de DTNB em 1 mL de metanol). Quando o ácido entrou em contato com o grupo SH – 36 tiol dos grupos sulfidrílicos, produziu então uma coloração amarela, a qual foi detectada por espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm. Os valores foram expressos em µg GSH/mg de proteína (SIMPLICIO *et al.*, 2015).

4.12 Quantificação de citocinas

Os kits para *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) de camundongo foram obtidos da R&D Systems (DuoSet). 100 mg do ventrículo esquerdo dos animais foram homogeneizados em 1 mL de tampão de extração de citocinas (PBS contendo

inibidor de proteases: 0,1 mM PMSF, 0,1 mM benzetonio clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% de Tween20. As citocinas avaliadas foram Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-10, Fator de necrose tumoral (TNF)- α e Interferon (IFN)- γ . Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc. Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As placas foram sensibilizadas com 50 μ L/poço com os respectivos anticorpos de captura. As placas foram incubadas em temperatura ambiente com agitação constante por duas horas. Após três lavagens com PBS-Tween 20 (0,05% - pH = 7,4), as placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e agitação constante com tampão de bloqueio (1% de BSA em PBS pH = 7,4). Após a retirada do tampão de bloqueio e nova etapa de lavagens, foi adicionado 50 μ L dos padrões (1000 – 2000 pg/mL) e das amostras diluídas em BSA-PBS (0,1% - pH = 7,4) e as placas foram incubadas por 12 horas a 4° C. Após incubação, as placas foram lavadas e foram adicionados 50 μ L/poço de anticorpo de detecção para as citocinas desejadas e, em seguida, as placas foram incubadas em temperatura ambiente e agitação constante por duas horas. Após nova lavagem, adicionou-se 50 μ L/poço de solução de estreptoavidina (25 μ L de estreptoavidina em 5 mL de solução BSA 0,1%) e incubou-se por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 50 μ L/poço de substrato o-fenilenodiamina (OPD – Sigma) diluído em tampão citrato (pH = 5) acrescido de H₂O₂ (30% v/v). As placas foram incubadas em câmara escura até que a reação ocorresse. A reação foi interrompida com adição de 50 μ L/poço de ácido sulfúrico 1 mol/L. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média e erro padrão ou com mediana e interquartis, conforme a dispersão dos dados. Os resultados foram submetidos a análise de variância de um (OneWay ANOVA) ou dois fatores (TwoWay ANOVA) seguida pelo tratamento com o pós-teste Tukey, Sidak ou Dunnett pelo programa Prisma (GraphPad Prism 8.0), conforme individualmente indicado nas legendas.

5 RESULTADOS

5.1 Os animais infectados com *Plasmodium chabaudi* apresentam sinais graves da infecção

Os animais BALB/C infectados com *P. chabaudi* (Protocolo1 – **Tabela 2**) apresentaram redução significativa de peso corporal, principalmente nos dias em que ocorriam picos de parasitemia, entre o 7º e 12º dia pós-infecção (dpi). A perda de peso corporal mais acentuada (aproximadamente 12%) ocorreu no 8º dpi (**Fig. 11A**). Os animais infectados apresentaram o pico de parasitemia entre o 8º e 12º dpi. O pico de parasitemia foi de $28 \pm 2\%$, após o qual os animais apresentaram queda acentuada no número de hemácias infectadas, negativando a partir do 14 dpi (**Fig. 11B**).

Os animais apresentaram uma diminuição significativa no número e hemácias e hematócrito, caracterizando quadro de anemia grave pela malária. A redução de hemácias ocorreu nos três grupos de animais infectados e no hematócrito principalmente nos grupos 7 e 14 dpi (**Fig 11C e 11D**). Claramente, após 28 dpi os animais conseguiram zerar a parasitemia, voltaram a ganhar peso e apresentaram recuperação da anemia, demonstrando assim que a infecção é autolimitada e o animal consegue sobreviver mesmo apresentando sinais graves da doença na fase mais aguda.

Fígado e baço são órgão-alvo na malária, pois estão diretamente envolvidos no ciclo de vida do parasito no hospedeiro (**ver figura 1**). Observou-se um aumento significativo no peso do fígado e baço nos três tempos da infecção analisados. Todos os grupos apresentaram aumento no peso do baço se comparados ao grupo controle (**Fig. 11E**).

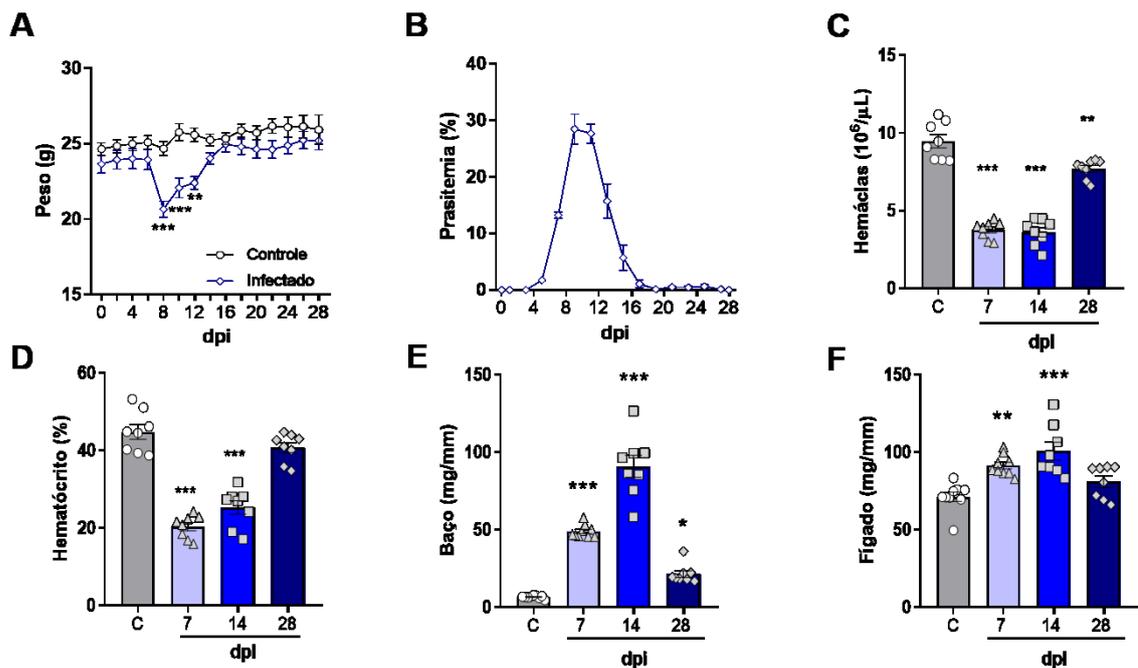


Figura 11: Caracterização da infecção por *Plasmodium chabaudi* em camundongos Balb/C: **A)** Acompanhamento do peso corporal de animais controle e infectados ao longo de 28 dias. **B)** Porcentagem de hemácia parasitadas ao longo de 28 dias de infecção. A contagem de eritrócitos parasitados foi feita em um microscópio de luz com objetiva de 100x. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle (não-infectado), 7, 14 e 28 dias pós-infecção (dpi). **C)** Contagem de hemácias. **D)** Porcentagem de hematócrito. **E)** Peso do Baço. **F)** Peso do Fígado. Dados expressos como média \pm EPM. N = 8. **P<0,01 e ***P<0,001 x Controle - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey. *P<0,05; **P<0,01 e ***P<0,001 x Controle - OneWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

5.2 Os animais infectados com *Plasmodium chabaudi* apresentaram alterações funcionais cardíacas

Para avaliar as alterações cardíacas de animais infectados com *Plasmodium chabaudi*, foi realizada análise *ex vivo* através da técnica de Langendorff. Foi possível observar que, durante a infecção, os animais dos grupos 7 e 14 dpi apresentaram alterações significativas na função cardíaca basal, observado pelos traçados representativos na **Figura 12A**, e na resposta a concentrações crescentes de isoprenalina (**Fig. 12B – 12D**). Na **Fig. 12B**, observa-se que, a partir do 7º dpi e de forma mais acentuada no 14º dpi, houve um aumento significativo na resposta inotrópica à isoprenalina, conforme demonstrado pelo aumento da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE). Para corroborar com esse resultado, ressalta-se que há um aumento significativo da área sob a curva (ASC) do respectivo parâmetro. Ademais, houve aumento significativo da derivada da pressão pela

derivada do tempo (dP/dt) máxima e mínima nos grupos 7 e 14 dpi comparados ao grupo controle, resultados corroborados pelos respectivos aumentos das ASC (Fig. 12C e 12D).

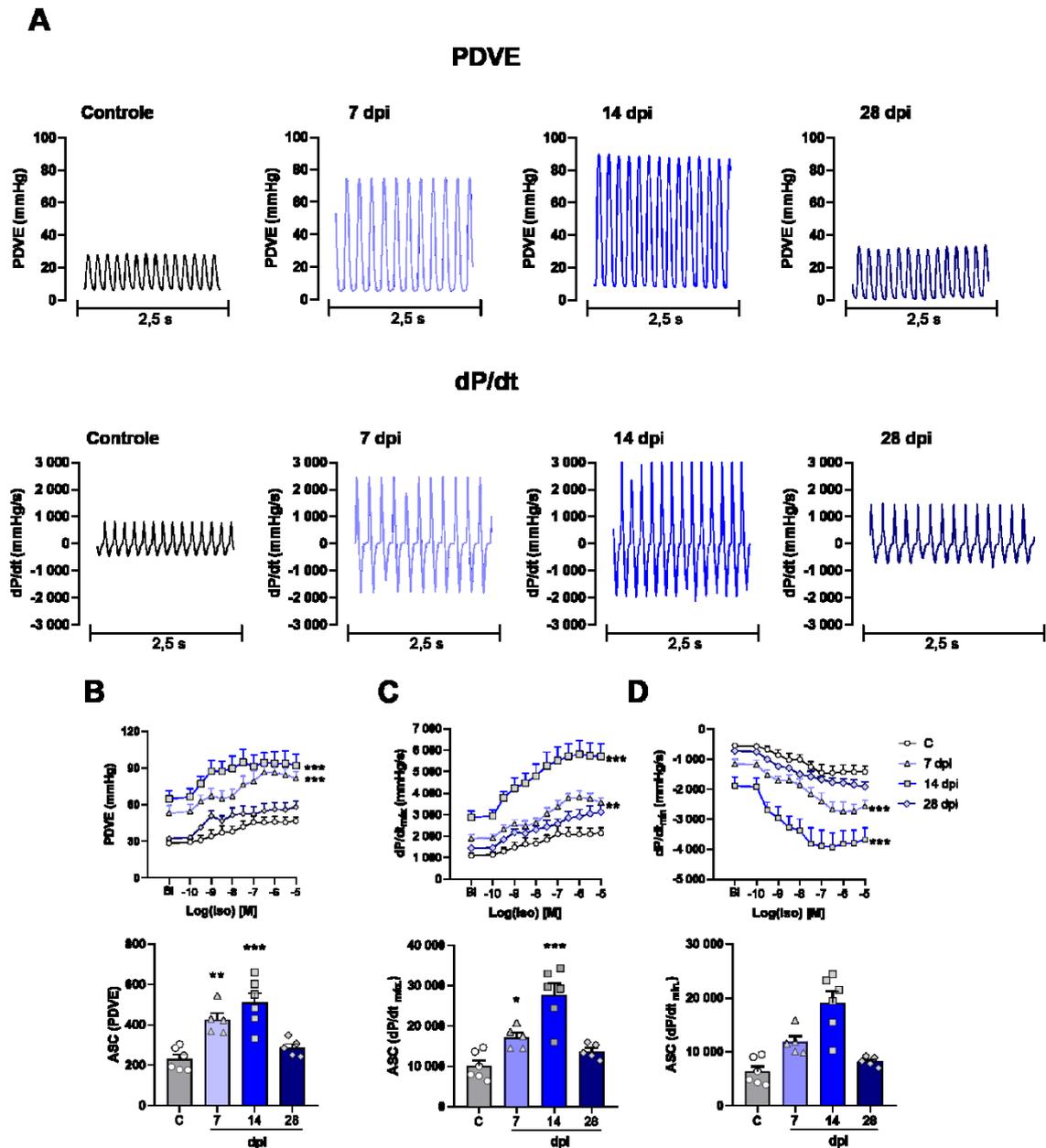


Figura 12: Avaliação das alterações funcionais cardíacas em animais infectados por *Plasmodium chabaudi*. Corações isolados de animais controle e infectados (7, 14 e 28 dpi) foram avaliados quanto à: **A)** Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e derivada da pressão pela derivada do tempo (dP/dt). Imagens representativas de um registro de 2,5 segundos (s). Função cardíaca sob estímulo farmacológico: **B)** PDVE e a respectiva área sobre a curva (ASC). **C)** dP/dt máxima ($dP/dt_{\text{máx.}}$) e **D)** mínima ($dP/dt_{\text{mín.}}$) da pressão pela derivada do tempo e suas respectivas área sob a curva (ASC). As avaliações quantitativas foram realizadas mediante estímulo farmacológico com concentrações crescentes de isoprenalina (Iso: 10^{-10} a 10^{-5} mol/L). Dados expressos como média \pm EPM. N = 5 - 6. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ x Controle - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

Para avaliar se as alterações funcionais eram resultado de uma eventual hipertrofia cardíaca, os corações dos diferentes grupos experimentais foram pesados. Observa-se que os animais do grupo 7 dpi apresentaram redução significativa no peso do coração, acompanhando a perda de peso causada pela infecção, que não é observada nos grupos 14 e 28 dpi (**Fig. 13A**). Portanto, as alterações funcionais encontradas parecem não ser resultado de mudanças anatômicas cardíacas durante a infecção.

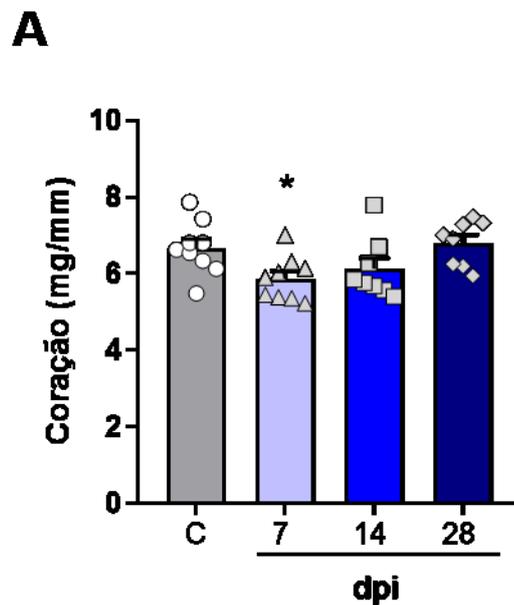


Figura 13: Avaliação do peso cardíaco de animais infectados com *Plasmodium chabaudi*. A) O peso dos corações (mg) foi corrigido pelo comprimento das tíbias (mm). Dados expressos como média \pm EPM. N = 8 - 9. * $P < 0,05$ x Controle - OneWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

5.3 Os animais infectados com *Plasmodium chabaudi* apresentaram estresse oxidativo no tecido cardíaco

Para avaliar se o estresse oxidativo seria responsável pelas alterações funcionais cardíacas causadas pela malária, foram determinadas as alterações oxidativas em lipídios presentes na membrana celular, pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Apenas os animais do grupo 14 dpi apresentaram aumento significativo dos níveis de malondialdeído (MDA) quando comparados ao grupo controle (**Fig. 14A**). No grupo 28 dpi, demonstrando novamente a característica autolimitada do modelo de infecção, não há aumento nos níveis cardíacos de MDA (**Fig. 14A**).

A

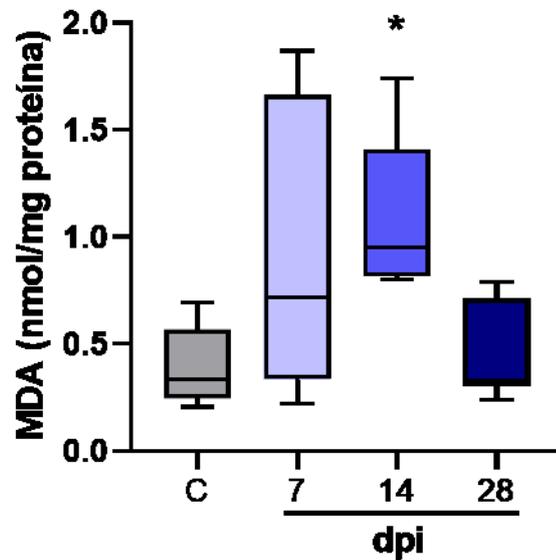


Figura 14: Avaliação da peroxidação lipídica. Detecção de estresse oxidativo em corações de animais infectados com *Plasmodium chabaudi*. **A)** Concentração de malondialdeído (MDA). As caixas (*box plots*) mostram intervalos interquartis e as barras representam os percentis 10, 50 (mediana) e 90. N = 6 – 7. *P<0,05 x Controle veículo - OneWay ANOVA, Pós-teste Sidak.

Para avaliar se as alterações funcionais encontradas nos corações de animais infectados com *Plasmodium chabaudi* eram correlacionadas ao desequilíbrio entre enzimas pró-oxidantes e antioxidantes, foram realizados experimentos para quantificar a atividade de superóxido dismutase (SOD) e os níveis de catalase e de glutathiona reduzida (GSH). Os resultados demonstraram significativa diminuição na atividade enzimática da SOD somente nos corações de animais 14 dpi comparados ao grupo controle (**Fig. 15A**). Não houve alteração na atividade da catalase (**Fig. 15B**) e de GSH (**Fig. 15C**) no tecido cardíaco em nenhum dos grupos infectados.

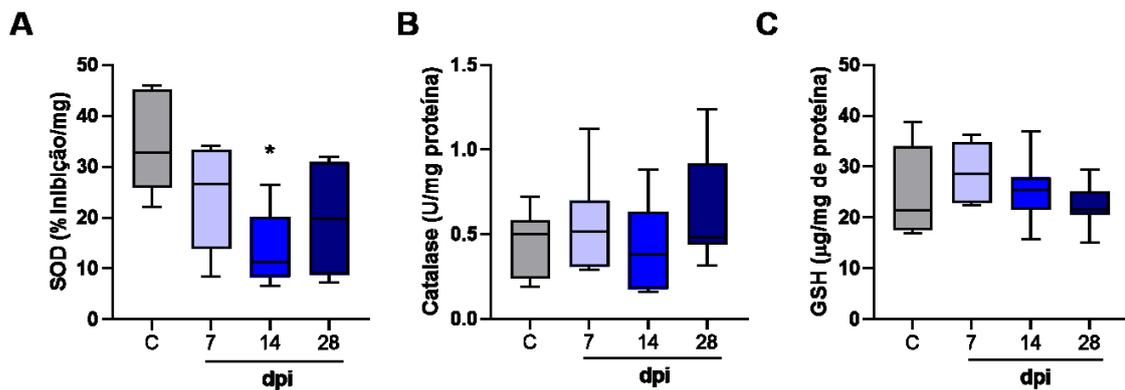


Figura 15: Sistemas antioxidantes em corações de camundongos infectados com *Plasmodium chabaudi*. **A)** Porcentagem de inibição da superóxido dismutase (SOD). N = 5 - 7. **B)** Níveis de catalase. N = 7 - 8. **C)** Níveis de glutatona reduzida (GSH). As caixas (*box plots*) mostram intervalos interquartis e as barras representam os percentis 10, 50 (mediana) e 90. N = 6 - 8. * $P < 0,05$ x Controle veículo - OneWay ANOVA, Pós-teste Sidak.

Considerando as alterações cardíacas por *P. chabaudi* encontradas e sabendo que há aumento de EROs durante a malária, nós partimos para análise do efeito da inibição da NADPH oxidase com apocinina sobre a função de coração isolado de animais infectados.

5.4 A inibição da NADPH oxidase não alterou o curso da infecção por *Plasmodium chabaudi*.

As principais alterações cardíacas funcionais durante a infecção causada pelo *Plasmodium chabaudi* ocorreram no 7º e 14º dpi. Entretanto, as alterações mais significativas foram observadas no 14º dpi. Portanto, neste segundo protocolo, optou-se por iniciar o tratamento dos animais com apocinina (30 mg/kg) quando os sinais da doença no coração já estavam presentes, isto é, do 7º ao 14º dpi (**Tabela 2**).

Não houve diferença significativa na variação de peso dos animais (**Fig. 16A**), parasitemia (**Fig. 16B**), pesos do baço (**Fig. 16C**) e fígado (**Fig. 16D**) entre os grupos tratados ou não com apocinina. Ou seja, o tratamento com apocinina não alterou o desenvolvimento dos principais sinais da infecção por *Plasmodium chabaudi*. Desta forma, pode-se inferir que a inibição da NADPH oxidase não modifica o curso da doença.

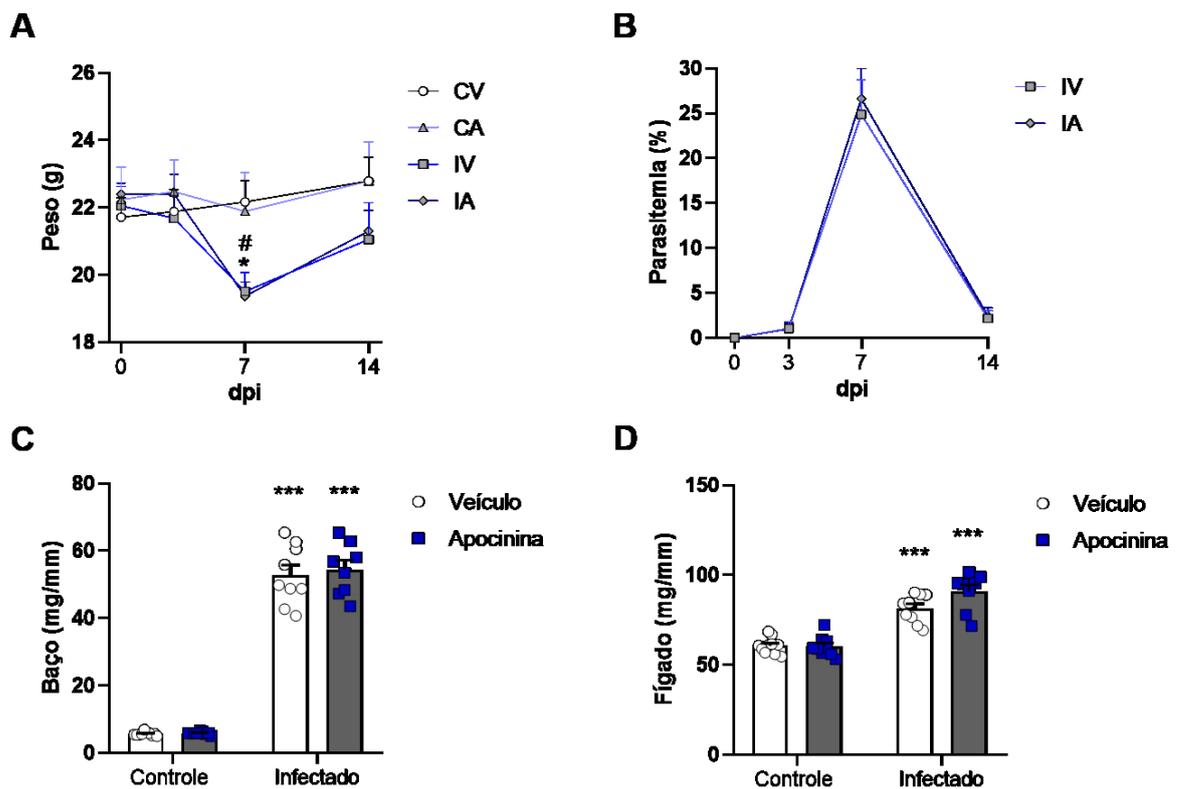


Figura 16: Efeitos da apocinina sobre os parâmetros da infecção por *Plasmodium chabaudi*. Os animais foram tratados com veículo (água) ou apocinina (30 mg/kg, gavagem) de 7 a 14 dias pós-infecção (dpi). **A)** Acompanhamento do peso corporal ao longo da infecção e tratamento. **B)** Porcentagem de parasitemia nos animais infectados. **C)** Peso do baço. **D)** Peso do fígado. Dados expressos como média \pm EPM. N = 6 - 9. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ x Controle veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey; # $P < 0,05$ x Controle apocinina - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

5.5 A inibição da NADPH oxidase modificou os parâmetros hematológicos encontrados durante a malária

Embora alguns parâmetros da infecção não tenham sido melhorados, quanto aos resultados de hemograma, o tratamento com apocinina contribuiu para melhora da anemia, conforme observado pelo número de hemácias (**Fig 17A**) e porcentagem de hematócrito (**Fig. 17B**). Além disso, embora não haja alteração do número de linfócitos (**Fig. 17C**), não se detectou aumento significativo de granulócitos induzido pela malária no grupo tratado com apocinina (**Fig. 17D**).

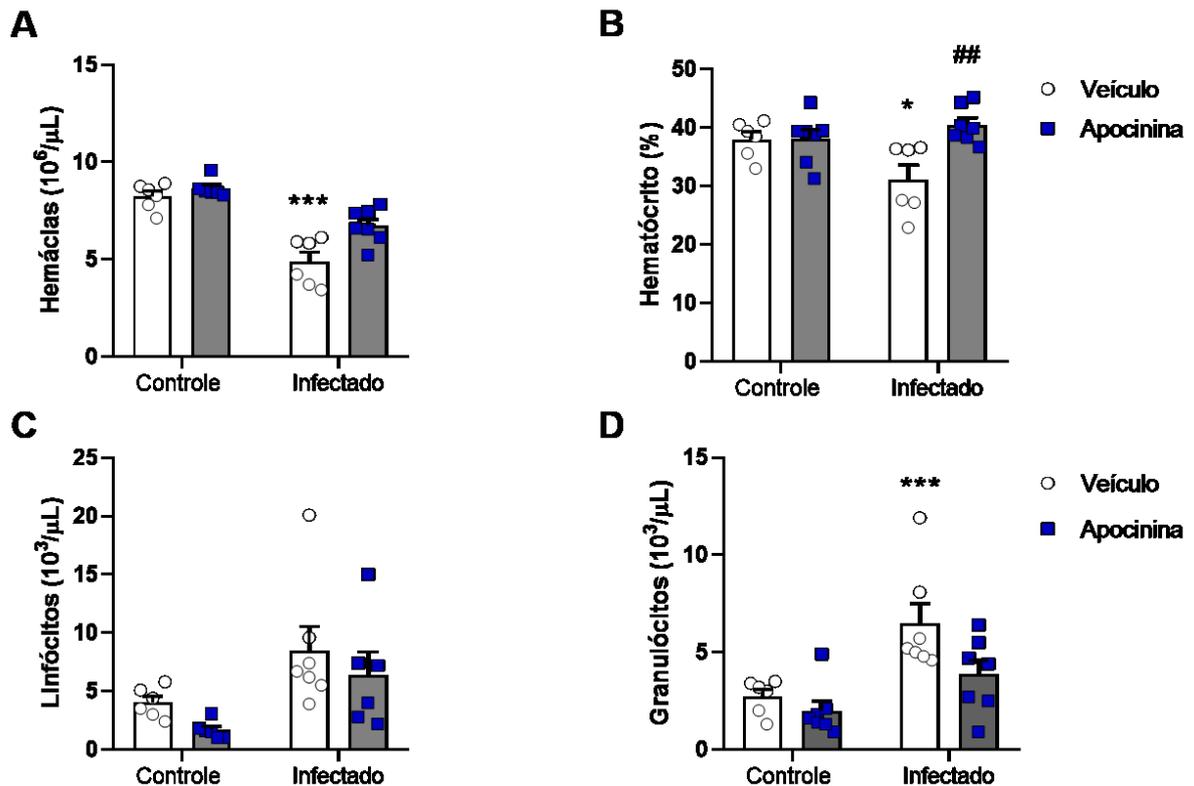


Figura 17: Parâmetros hematológicos após tratamento com apocinina. Animais foram infectados com *Plasmodium chabaudi* e tratados ou não com apocinina (30 mg/kg). **A)** Hemácias. **B)** Hematócrito. **C)** Linfócitos. **D)** Granulócitos. Dados expressos como média \pm EPM. N = 6 – 7. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ x Controle veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey; ## $P < 0,01$ x Infectado veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

5.6 A inibição da NADPH oxidase reverteu a hipercontratibilidade cardíaca em resposta ao aumento da pré-carga cardíaca e às concentrações crescentes de isoprenalina

Os corações dos animais dos diferentes grupos experimentais do Protocolo 2 (Tabela 2) foram isolados e tiveram a função cardíaca avaliada mediante a uma curva de pré-carga ou a concentrações crescentes de isoprenalina.

Para avaliar a capacidade do ventrículo esquerdo em responder ao aumento de pré-carga, foi feita uma curva com pressões de enchimento de 5, 10 e 20 mmHg. Foi possível observar que os animais do grupo infectado veículo apresentaram aumento da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) (Fig. 18A), aumento da dP/dt máxima (Fig. 18B) e mínima (Fig. 18C) para todas as pressões de

enchimento. O tratamento com apocinina reverteu a hipercontratilidade cardíaca desencadeada pela malária grave (**Fig. 18A – 18C**).

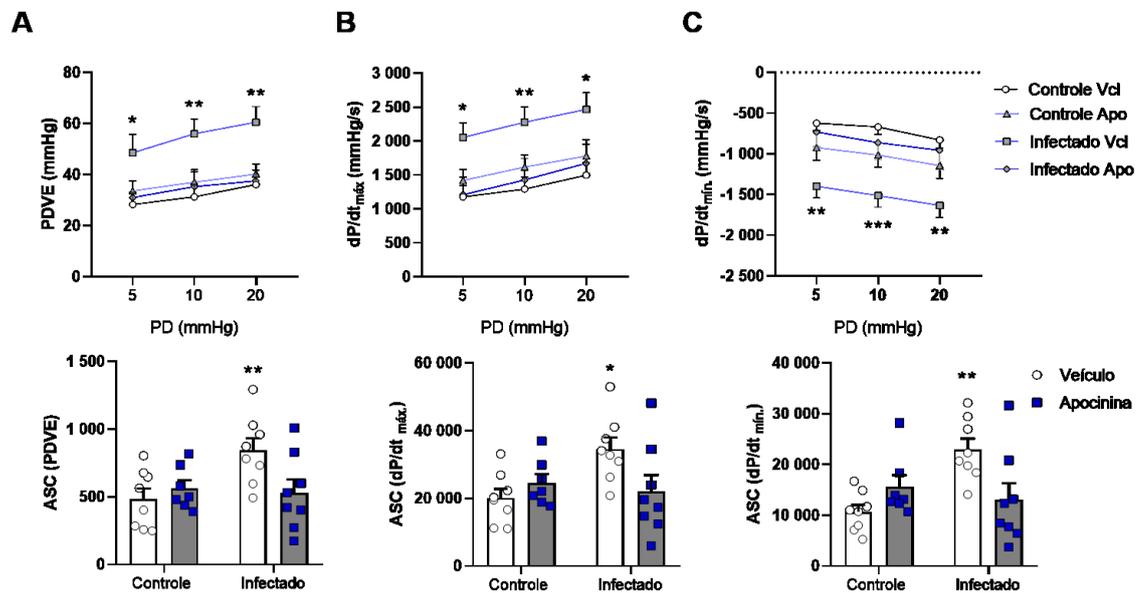


Figura 18: Reposta de corações isolados ao aumento da pré-carga. A) Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e a respectiva área sob a curva (ASC). **B)** Derivadas máxima ($dP/dt_{máx.}$) e **C)** mínima ($dP/dt_{mín.}$) da pressão pelo tempo e as respectivas efeito ASC. Dados expressos como média \pm EPM. N= 7- 8. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ x Controle veiculo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Dunnett.

Tanto na figura 18 como na figura 19, nota-se que a inibição do estresse oxidativo pela apocinina reverteu a hipercontratilidade cardíaca basal de animais infectados com *Plasmodium chabaudi*. Nas imagens representativas da **Figura 19A**, observa-se que o aumento da PDVE, bem como da dP/dt máxima e mínima induzido pela malária, foram revertidos pelo tratamento com apocinina. Sob estímulo farmacológico com isoprenalina (10^{-10} – 10^{-5} mol/L), observou-se que a apocinina reverteu de maneira significativa o aumento da PDVE (**Fig. 19B**), da dP/dt máxima (**Fig. 19C**) e mínima (**Fig. 19D**) causados pela infecção. Os resultados ficam ainda mais claros quando são analisadas as respectivas ASC da PDVE, dP/dt máxima e mínima (**Fig. 19B – 19D**). Assim, infere-se que a NADPH oxidase tem papel relevante no desenvolvimento de alterações funcionais cardíacas durante a malária grave, já que a inibição da enzima reverte o prejuízo encontrado durante a infecção.

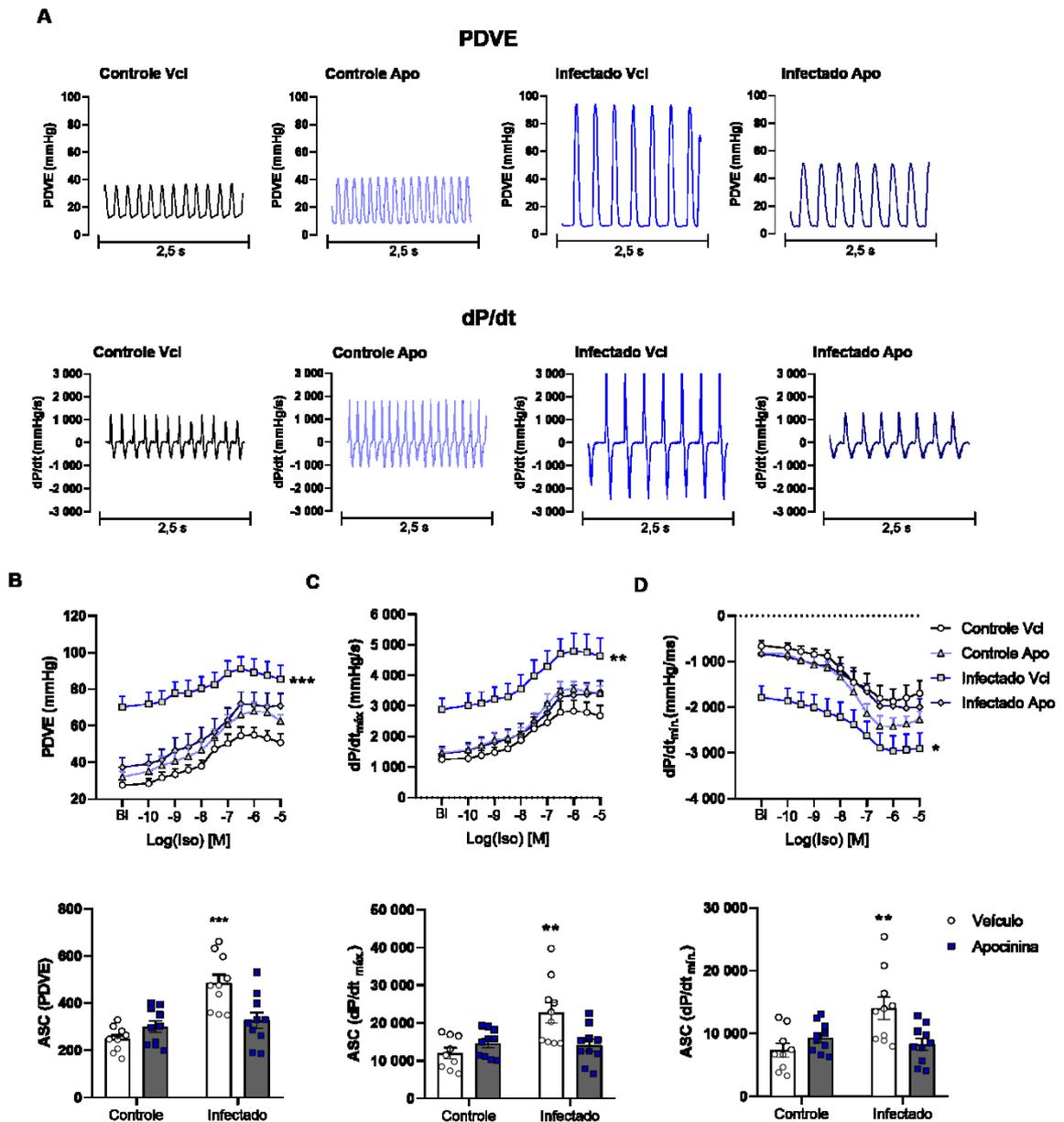


Figura 19: Avaliação da função cardíaca *ex vivo* após inibição do estresse oxidativo. Corações isolados de animais infectados com *Plasmodium chabaudi* e tratados ou não com apocinina (30 mg/kg): **A**) Imagens representativas de um registro de 2,5 segundos (s) da função cardíaca em estado basal da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e da derivada da pressão pela derivada do tempo (dP/dt). **B**) PDVE e a respectiva área sobre a curva (ASC). **C**) dP/dt máxima (dP/dt máx.) e **D**) dP/dt mínima (dP/dt mín.) da pressão pela derivada do tempo e suas respectivas ASC. O estímulo farmacológico com concentrações crescentes de isoprenalina (Iso: 10^{-10} a 10^{-5} mol/L). Dados expressos como média \pm EPM. N = 8 - 10. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 x Controle veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

5.7 A óxido nítrico sintase (NOS) não participa das alterações cardíacas induzidas por NADPH oxidase

Para avaliar se a alteração do padrão de resposta à isoprenalina estava associada à variações dos níveis de NO entre os grupos, os corações foram perfundidos com inibidor de NOS, o L-NAME, e submetidos à isoprenalina. A inibição de NOS não alterou a resposta contrátil à isoprenalina. Isto é: nos diferentes grupos experimentais, houve aumento dose-dependente da PDVE (**Fig. 20A**), da dP/dt máxima (**Fig. 20B**) e mínima (**Fig. 20C**), sendo a resposta à isoprenalina no grupo infectado veículo maior que a dos demais grupos.

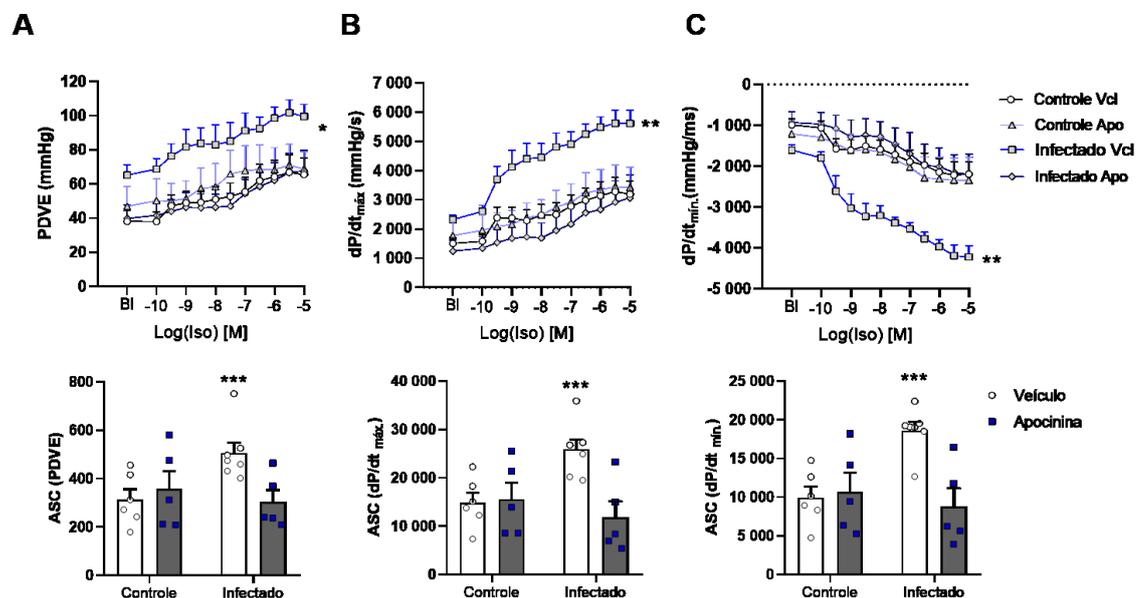


Figura 20: Avaliação da função cardíaca mediante inibição de óxido nítrico sintase. Corações isolados de animais infectados com *Plasmodium chabaudi* e tratados ou não com apocinina (30 mg/kg): **A)** Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e a respectiva área sobre a curva (ASC). **B)** Derivadas máxima (dP/dt_{max}) e **C)** mínima (dP/dt_{min}) da pressão pela derivada do tempo e suas respectivas ASC. As avaliações foram realizadas mediante perfusão constante com éster metílico de L-nitroarginina (L-NAME: 10^{-4} mol/L) e estímulo farmacológico com concentrações crescentes de isoprenalina (Iso: 10^{-10} a 10^{-5} mol/L). Dados expressos como média \pm EPM. N = 5 - 7. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ x Controle veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

Para comparar os resultados de função cardíaca encontrados na ausência ou presença de L-NAME, as ASCs dos parâmetros de contratilidade são mostradas lado a lado na **Figura 21**. Os valores das ASC de PDVE (**Fig. 21A**) e dP/dt máxima (**Fig. 21B**) e mínima (**Fig. 21C**) são semelhantes sem [(-) L-NAME] ou sob inibição [(+) L-

NAME] de NOS. Logo, o NO não participa da resposta à isoprenalina em animais controles e não foi modulado durante a infecção ou pelo tratamento com apocinina.

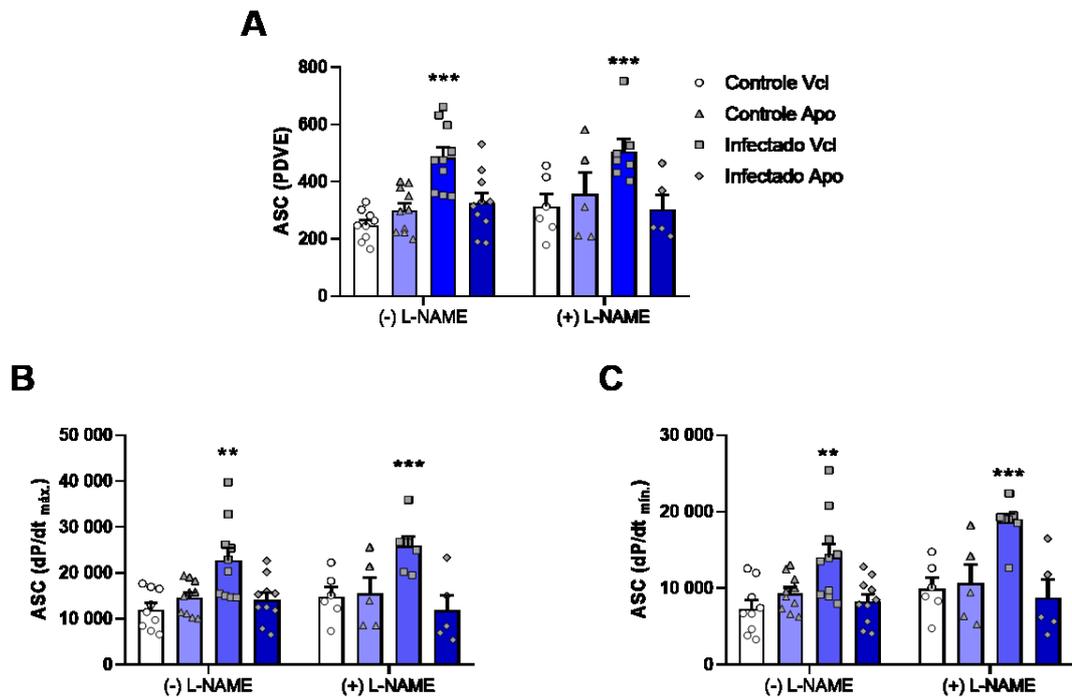
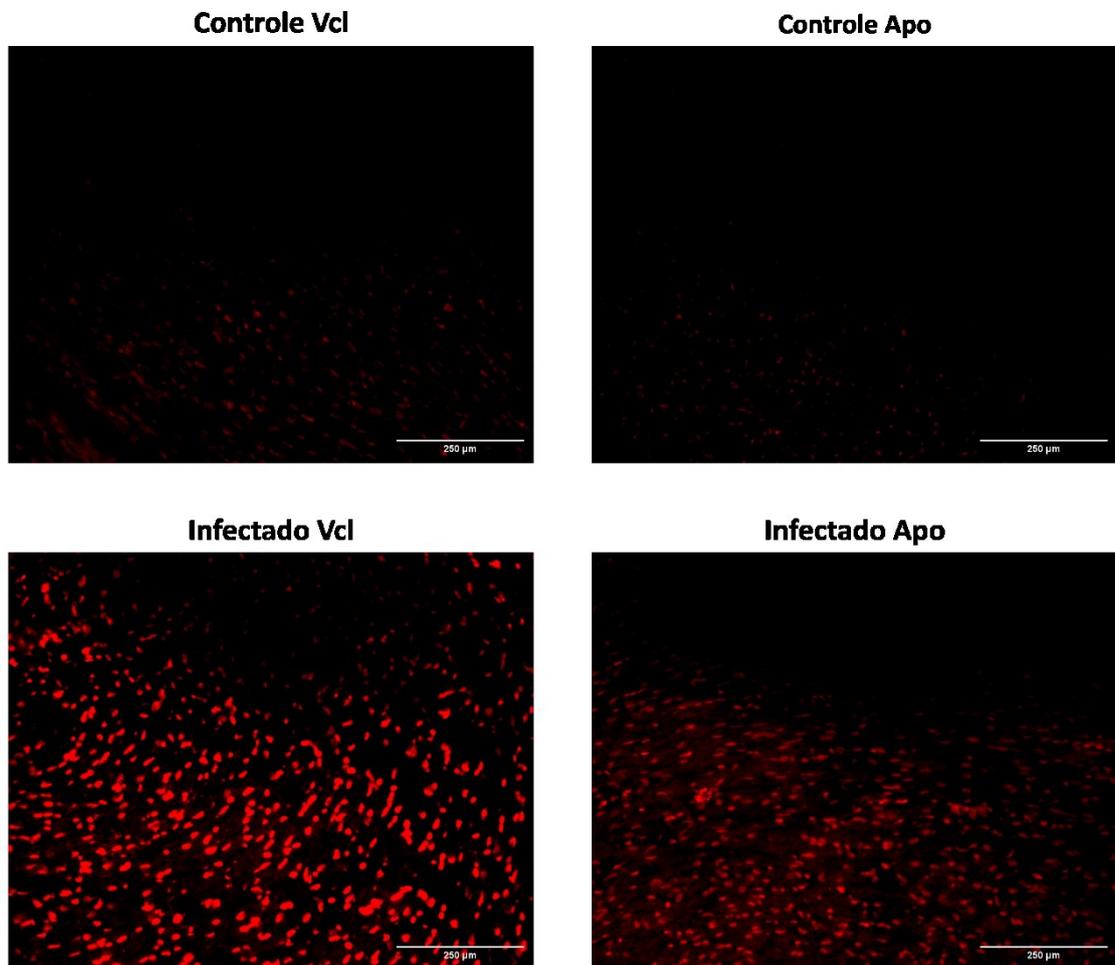


Figura 21: Efeito da inibição das óxido nítrico sintases sobre os parâmetros de contratilidade à isoprenalina entre os grupos experimentais. Comparação das repostas contrátil à isoprenalina sem inibição [(-) L-NAME] ou com inibição de óxido nítrico sintase [(+) L-NAME] nos quatro grupos experimentais. **A)** Área sobre a curva (ASC) da PDVE, **B)** dP/dt máxima e **C)** dP/dt mínima. Dados expressos como média \pm EPM. N = 5 - 10. *P<0,05 e ***P<0,001 x Controle veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

5.8 A inibição da NADPH oxidase reverteu o estresse oxidativo no coração durante a infecção por *Plasmodium chabaudi*

Como demonstrado anteriormente (**Fig. 14A**), os animais infectados com *Plasmodium chabaudi* apresentaram estresse oxidativo cardíaco. O tratamento com apocinina reverteu o estresse oxidativo no coração dos animais infectados com *Plasmodium chabaudi*. Houve redução significativa da produção de $\cdot O_2^-$, detectado por sonda fluorescente (**Fig. 22A e 22B**) e houve diminuição das concentrações de MDA de maneira significativa (**Fig. 23A**). Portanto, a partir destes resultados, nota-se que a NADPH oxidase tem papel importante para o estresse oxidativo cardíaco em animais com malária grave.

A



B

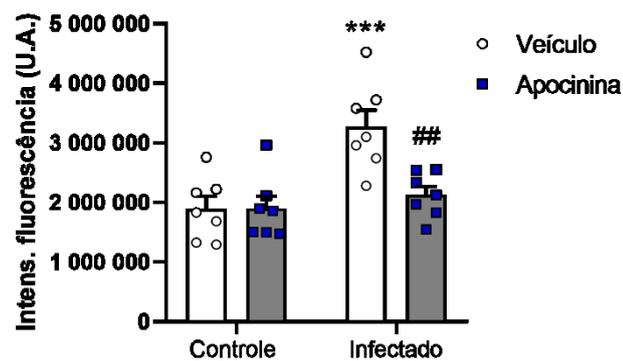


Figura 22: Avaliação *in situ* da produção de espécies reativas do oxigênio. Criossecções transversais de coração foram usadas para detecção de espécies reativas do oxigênio por sonda fluorescente (dihidroetidina, DHE). **A)** Fotomicrografias ilustrativas em aumento de 200x da fluorescência vermelha dos produtos da reação do DHE com ânion superóxido e outras espécies reativas do oxigênio. **B)** Resultados quantitativos da intensidade fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.). Dados expressos como média \pm EPM. N = 7. ***P<0,001 x controle veículo; ##P<0,01 x infectado veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

A

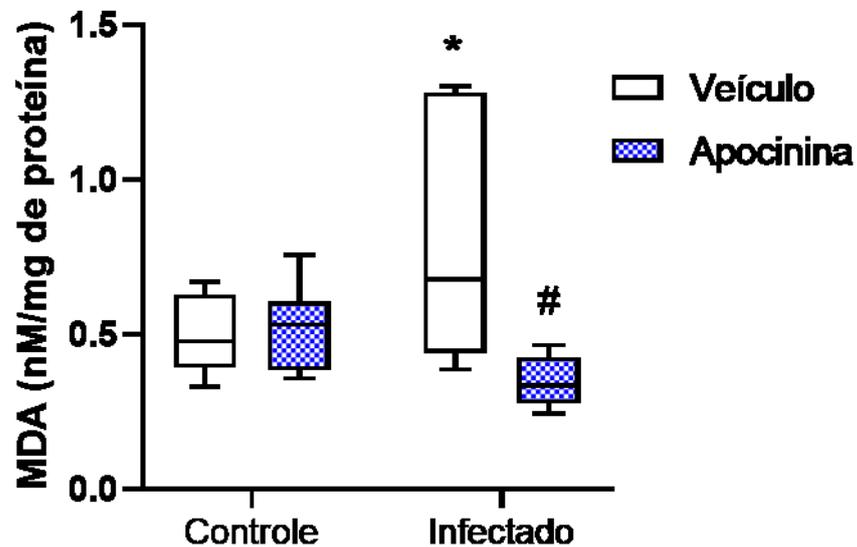


Figura 23: Avaliação do estresse oxidativo pela peroxidação lipídica. O marcador de peroxidação lipídica foi avaliado no coração de animais infectados ou não, tratados ou não com apocinina (30 mg/kg). **A)** Concentração de malondialdeído (MDA). As caixas (*box plots*) mostram intervalos interquartis e as barras representam os percentis 10, 50 (mediana) e 90. N = 6 – 7. *P<0,05 x Controle veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Sidak.

Como demonstrado anteriormente (**Fig. 15A**), a infecção por *Plasmodium chabaudi* reduz a atividade da enzima SOD, favorecendo o aumento do estresse oxidativo no coração. O tratamento com apocinina restaurou a atividade da SOD no grupo infectado apocinina (**Fig. 24A**). A partir desse resultado, infere-se que a inibição da NADPH oxidase restabelece o equilíbrio entre sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, a favor dos últimos, no coração de animais infectados por *Plasmodium chabaudi*.

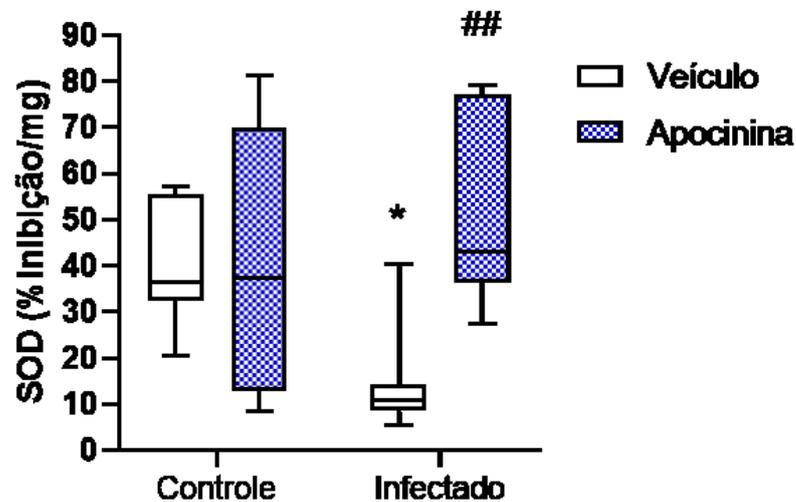
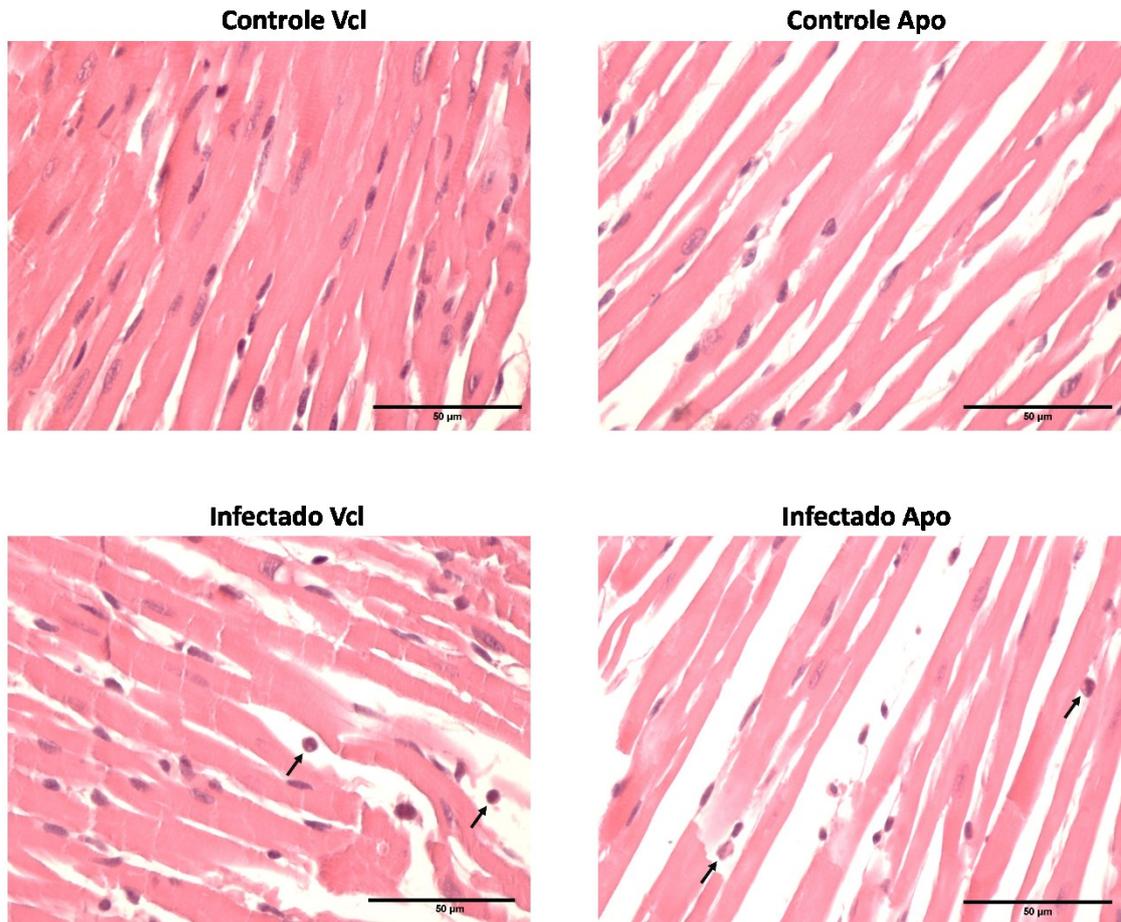
A

Figura 24: Efeitos do tratamento com apocinina sobre a redução da atividade cardíaca de SOD induzida pela infecção por *Plasmodium chabaudi*. A) Porcentagem de inibição da superóxido dismutase (SOD). As caixas (*box plots*) mostram intervalos interquartis e as barras representam os percentis 10, 50 (mediana) e 90. N = 7 - 8. * $P < 0,05$ x Controle veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Sidak; ## $P < 0,01$ x Infectado veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Sidak.

5.9 Influência da inibição da NADPH oxidase nos parâmetros inflamatórios

O corações dos animais infectados com *Plasmodium chabaudi* apresentaram infiltrado inflamatório e fibrose leves e esse quadro não foi revertido pelo tratamento com apocinina (**Fig. 25A e 25B**). Portanto, a inibição da NADPH oxidase não impede os danos causados no coração pela malária.

A



B

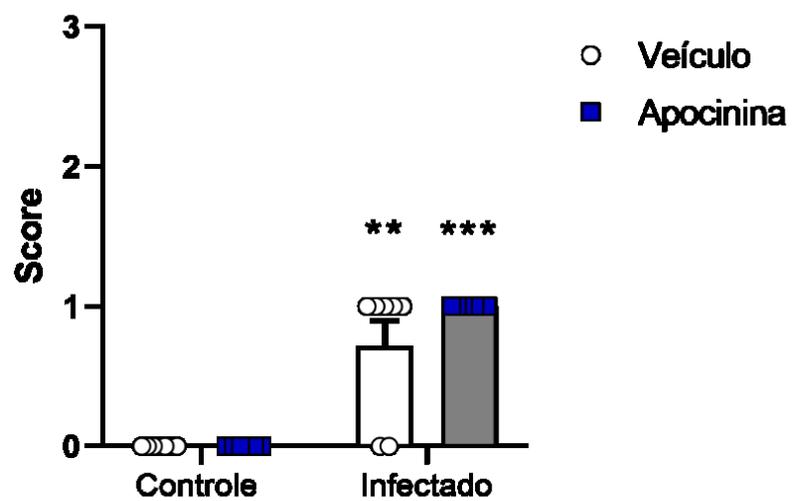


Figura 25: Score histopatológico. Análise histopatológica do coração dos 4 grupos experimentais: controle veículo; controle tratado com apocinina; infectado veículo; infectado tratado com apocinina. **A)** Fotomicrografias do tecido cardíaco em H&E dos 4 grupos experimentais. Aumento de 400x. **B)** Score histopatológico. Dados expressos como média ± EPM. N = 6-7. **P<0,01; ***P<0,001 x controle veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

Para avaliar se a inibição da NADPH oxidase alteraria a inflamação cardíaca, foram realizados ensaios imunoenzimáticos para quantificar citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Os animais infectados apresentaram aumento significativo das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β (**Fig. 26A**) e IL-6 (**Fig. 26B**). De forma interessante, a inibição da NADPH oxidase durante a infecção foi importante para reduzir as concentrações de IL-1 β e IL-6 (**Fig. 26A e 26B**). A infecção não causou aumento nas concentrações de TNF- α (**Fig. 26D**) e nem IFN- γ (**Fig. 26E**).

Quanto à citocina anti-inflamatória, houve aumento das concentrações de IL-10 nos corações dos animais infectados, que se mantiveram levados no grupo infectado tratado com apocinina (**Fig. 26C**).

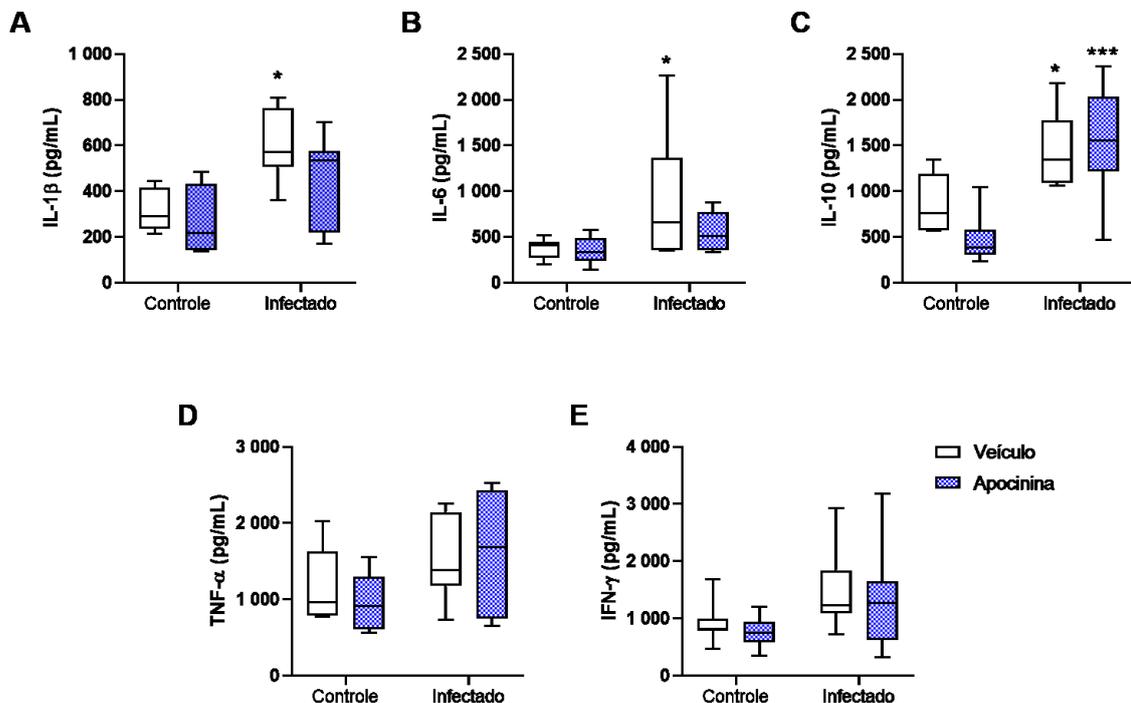


Figura 26: Quantificação de citocinas cardíacas. Dosagem de citocinas em corações de animais infectados com *Plasmodium chabaudi*, tratados ou não com apocinina (30 mg/kg). **A)** Interleucina (IL)- 1 β . **B)** Interleucina-6. **C)** Interleucina-10. **D)** Fator de necrose tumoral (TNF)- α . **E)** Interferon (IFN)- γ . As caixas (*box plots*) mostram intervalos interquartis e as barras representam os percentis 10, 50 (mediana) e 90. N= 6-7. *P<0,05 x Controle veículo - TwoWay ANOVA, Pós-teste Sidak.

5.10 A deleção da NOX2 não altera o curso da malária grave

A isoforma NOX2, pertencente à família das enzimas NADPH oxidases, tem relevante papel no desequilíbrio redox durante quadros infecciosos e é uma das isoformas que são encontradas em cardiomiócitos (WAGNER *et al.*, 2014). Para confirmar o papel da NOX2 nas alterações que ocorrem durante a infecção por *Plasmodium chabaudi*, animais NOX2^{-/-} foram infectados e eutanasiados após 14 dias de infecção (Protocolo 3 – Tabela 2).

Foram realizadas análises das principais características encontradas durante a infecção por *Plasmodium chabaudi*. Os resultados demonstraram que animais que não possuem NOX2 funcional não apresentam alterações no curso da infecção. Não houve diferença na parasitemia, os animais NOX2^{-/-} apresentaram porcentagem de hemácias infectadas comparável aos animais *wild type* (wt) infectados (Fig. 27A). Os animais NOX2^{-/-}, assim como ocorre nos animais wt, apresentaram aumento significativo do peso de órgãos-alvo, fígado (Fig. 27B) e baço (Fig. 27C), quando comparados ao seu respectivo controle (não infectado). Assim, a ausência da NOX2, de forma similar ao que aconteceu com a inibição farmacológica com apocinina, não alterou o curso da infecção.

Os corações de animais infectados com *Plasmodium chabaudi* apresentaram alterações histopatológicas sutis, como presença de infiltrado inflamatório e fibrose moderadas. A ausência da NOX2 não protegeu os animais infectados das alterações histopatológicas cardíacas (Fig. 28A e 28B).

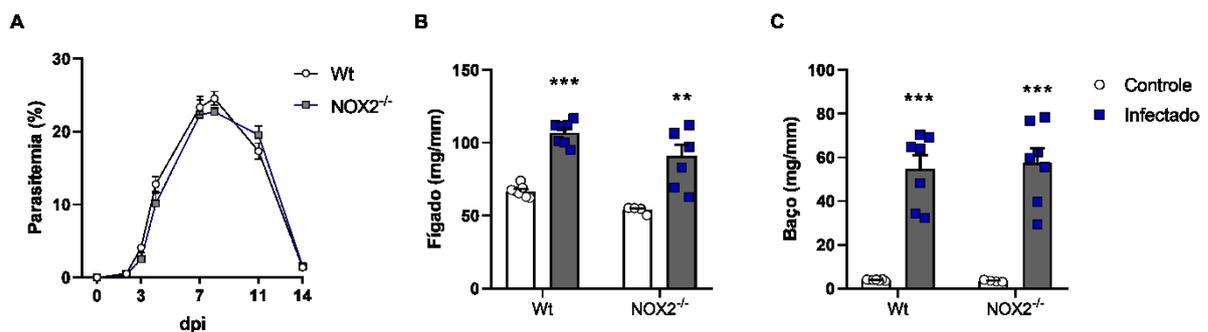


Figura 27: Caracterização da infecção em animais C57Bl/6 selvagens (*wild type*, Wt) e nocautes para NOX2 (NOX2^{-/-}). A) Parasitemia. B) Peso do fígado. C) Peso do baço. Dados expressos como média ± EPM. N = 3-7. **P<0,01; ***P<0,001 x respectivo Controle – TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

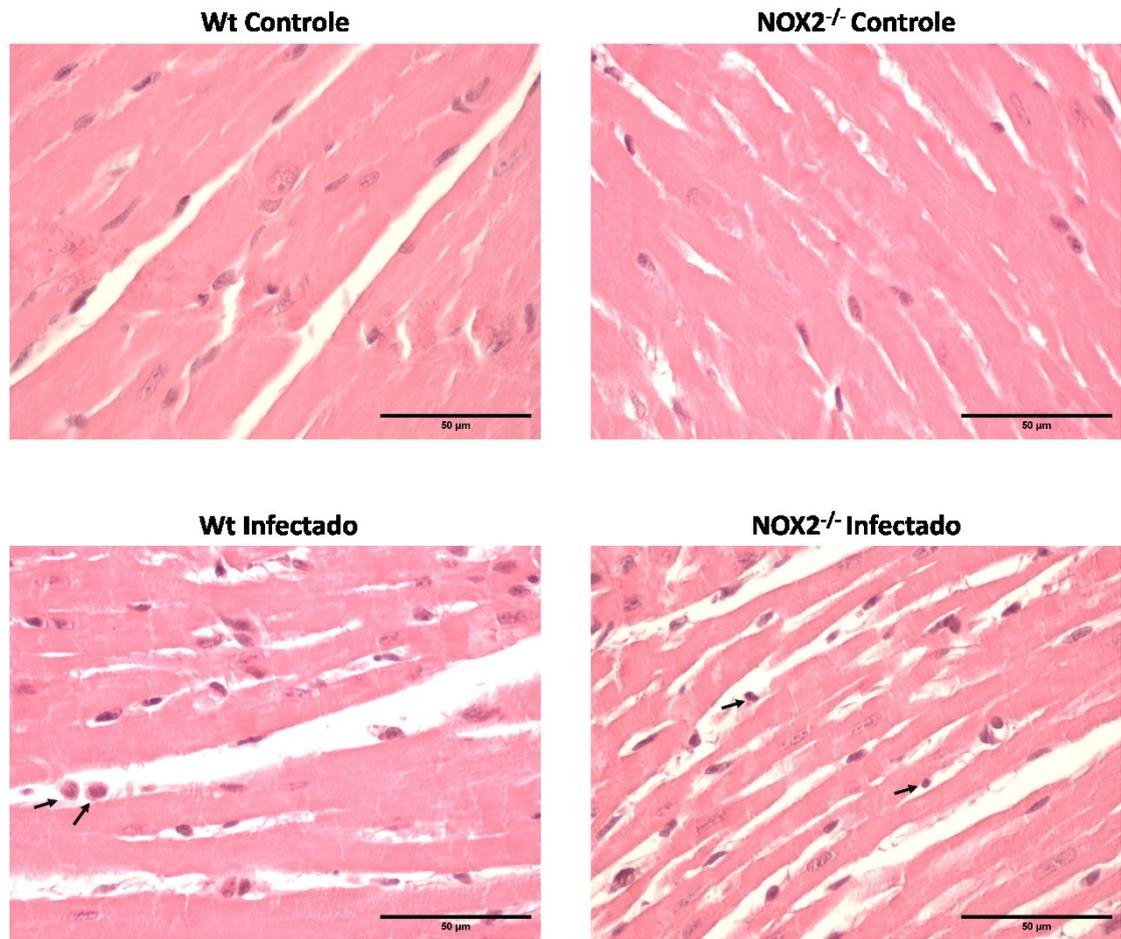
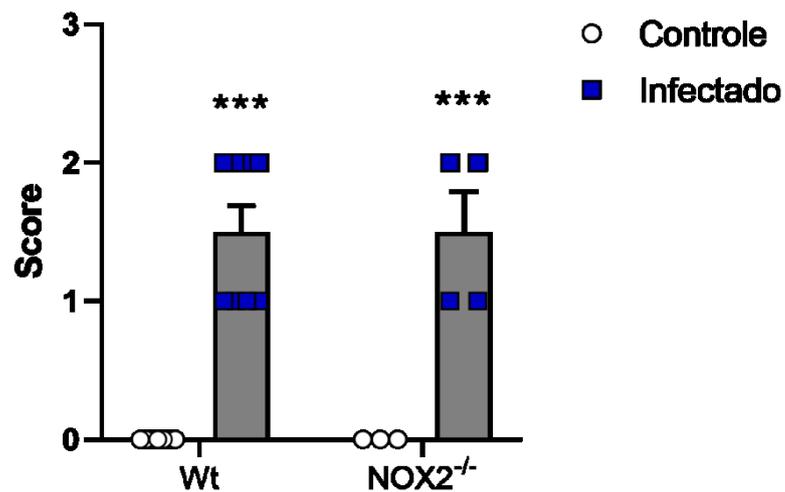
A**B**

Figura 28: Score histopatológico. Análise histopatológica do coração dos 4 grupos experimentais: controle selvagem (Wt - C) não infectado; nocaute para NOX2 (NOX2^{-/-} - C) não infectado; infectado selvagem (Wt - I); infectado nocaute para NOX2 (NOX2^{-/-} - I). **A)** Fotomicrografias do tecido cardíaco em H&E dos 4 grupos experimentais. **B)** Score histopatológico. Aumento de 400x. Dados expressos como média ± EPM. N = 3-7. ***P<0,001 x controle Wt - TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

5.11 A ausência da NOX2 impediu o desenvolvimento de disfunção cardíaca durante a infecção por *Plasmodium chabaudi*

Para confirmar a participação da NOX2 no desenvolvimento das alterações cardíacas induzidas pela malária grave, foram realizadas análises funcionais *ex vivo* em corações isolados de animais *wt* e $NOX2^{-/-}$. Em animais $NOX2^{-/-}$ não há desenvolvimento de alterações cardíacas desencadeadas pela infecção por *Plasmodium chabaudi*. Observa-se que na ausência de NOX2, os animais infectados não apresentam elevação de PDVE (**Fig. 29A**), dP/dt máxima (**Fig. 29B**) e mínima (**Fig. 29C**). Os resultados são validados pelas diferenças significativas encontradas nas análises de ASC (**Fig. 29B e 29C**). Desse modo, confirma-se que a NOX2 participa do desenvolvimento de alterações funcionais cardíacas que estão presentes durante a infecção malárica.

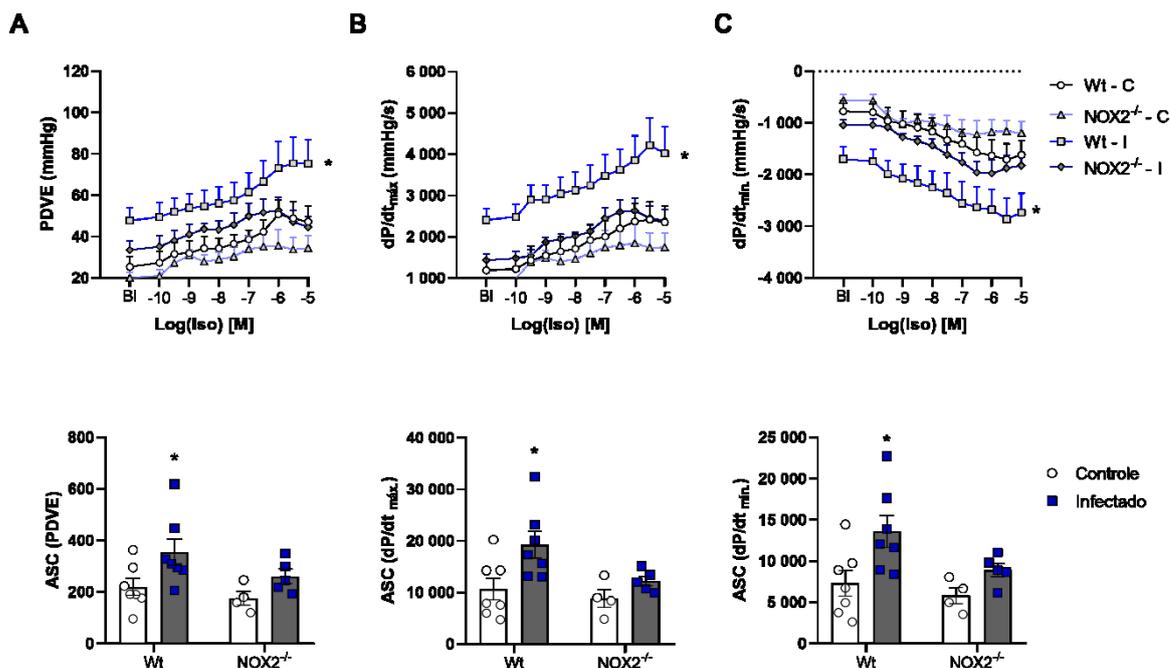


Figura 29: Avaliação da função cardíaca *ex vivo* em animais C57Bl/6 selvagens (*wild type*, Wt) e $NOX2^{-/-}$. Corações isolados de animais dos 4 grupos experimentais: controle (não infectado) selvagem (Wt - C); controle nocaute para NOX2 ($NOX2^{-/-}$ - C); infectado selvagem (Wt - I); infectado nocaute para NOX2 ($NOX2^{-/-}$ - I). **A)** Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e a respectiva área sobre a curva (ASC). **B)** Derivadas máxima ($dP/dt_{máx.}$) e **C)** mínima ($dP/dt_{mín.}$) da pressão pela derivada do tempo e suas respectivas ASC. Curva realizada sob estímulo farmacológico com concentrações crescentes de isoprenalina (Iso: 10^{-10} a 10^{-5} mol/L). Dados expressos como média \pm EPM. N = 4 - 7. * $P < 0,05$ X Wt controle TwoWay ANOVA, Pós-teste Tukey.

6 DISCUSSÃO

A malária é considerada uma doença tropical complexa, pois causa danos multissistêmicos, que contribuem para a evolução de quadros clínicos graves, tornando a infecção por *Plasmodium* a 6^a causa de morte em países de baixa renda (WHO, 2021). Estudos demonstram que os principais órgãos afetados pela forma grave da doença são o cérebro, os rins, intestino, fígado, pulmão (COBAN *et al.*, 2018; MOXON *et al.*, 2020; NGAI *et al.*, 2022; NISHANTH *et al.*, 2019). Entretanto, existem alguns poucos estudos que descrevem como a infecção afeta a função cardíaca, embora os mecanismos que causam alterações funcionais no coração sejam ainda desconhecidos.

Neste presente trabalho, foi demonstrado que os animais infectados com *Plasmodium chabaudi* desenvolvem importantes sinais clínicos da malária grave, como perda de peso acentuada, hiperparasitemia, sinais claros de anemia grave, hepatomegalia e esplenomegalia. O baço é um dos órgãos mais afetados, pois além de participar da resposta imunológica, há intensa destruição de hemácias pelo protozoário. As hemácias danificadas são encaminhadas para o baço, onde ocorre aumento da hemocaterese. No ciclo de *Plasmodium sp.*, o fígado faz parte da etapa de desenvolvimento do protozoário no hospedeiro vertebrado e, em determinadas situações, exerce função hemocaterética, contribuindo para a eliminação de hemácias danificadas. Assim, o aumento do peso destes órgãos durante a fase aguda está diretamente relacionado à anemia induzida pelo *Plasmodium chabaudi*.

O MEMG por *Plasmodium chabaudi* AS, como já descrito na literatura (CRAIG *et al.*, 2012; DE MENEZES *et al.*, 2019; LAMB *et al.*, 2008; STEPHENS *et al.*, 2012), mimetiza aspectos clínicos da malária grave. As alterações mais relevantes acontecem entre 7 e 14 dpi, não ocorrendo mortalidade. Esta espécie do protozoário é utilizada normalmente como MEMG para investigar alterações multissistêmicas. A infecção experimental apresenta limitações e, sob determinadas características, não pode ser comparada à infecção que acontece em seres humanos. A malária experimental causada pelo *Plasmodium chabaudi*, como demonstrado em outros trabalhos (DE MENEZES *et al.*, 2019) e nos resultados aqui apresentados, é autolimitada, ou seja, os animais infectados com a cepa AS apresentam recuperação e cessação dos sinais graves da doença após 28 dias de infecção. Entretanto, é

importante ressaltar que, apesar do caráter autolimitado da infecção experimental, os sinais graves da doença são apresentados em um intervalo de tempo significativo no qual é possível avaliar danos expressivos à função de órgãos-alvo, como o coração. Estes fatos justificam nossa escolha por este modelo.

Além de caracterizarmos o curso temporal dos sinais no MEMG, fomos adiante e mostramos que os corações apresentavam um padrão de contração atípico, que coincidia com o período de manifestação da doença. Os resultados demonstraram, de forma inédita, que os corações isolados de animais infectados com *Plasmodium chabaudi* apresentam hipercontratilidade em estado basal e após doses crescentes de isoprenalina. Esta maior tensão desenvolvida pelos corações dos animais infectados não se relaciona à hipertrofia do órgão, já que não foram observadas alterações no peso do coração. Na literatura não há trabalhos que demonstrem como a infecção grave possa alterar a contratilidade cardíaca.

É sabido que a hipertrofia cardíaca é precedida por um estágio inicial de hipercontratilidade que antecede a insuficiência cardíaca. Nesta situação, há aumento do transiente de Ca^{2+} e nas quantidades de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático. Como mecanismo, demonstrou-se que além do aumento na condutância de Ca^{2+} , ocorre diminuição de proteínas como a SERCA2a e RyR2 e aumento de NCX e PLB (WANG *et al.*, 2009). Além das alterações no influxo e efluxo de Ca^{2+} , a cardiomiopatia hipertrófica também pode ser caracterizada por mutações na beta-miosina cardíaca, que resultam em função ventricular hiperdinâmica, hipercontratilidade e prejuízo no relaxamento dos cardiomiócitos (SPUDICH, 2014).

Aos 28 dpi no MEMG que usamos, a função cardíaca é reestabelecida ao seu estado de homeostasia, bem como a parasitemia e a maior parte dos sinais da doença. Porém, é importante salientar que, apesar do modelo de infecção por *Plasmodium chabaudi* ser autolimitado e após a fase aguda da doença os animais apresentam recuperação, o estudo dos eventos que ocorrem durante a fase aguda permitem entender aspectos fisiopatológicos durante a malária que ainda precisam ser elucidados. Neste contexto, faz-se necessário entender quais mecanismos estariam alterados para que os animais desenvolvam hipercontratilidade cardíaca.

Os animais, no momento em que havia sinais agudos da doença, apresentaram alterações funcionais cardíacas representadas por um estado hiperdinâmico. Para tentar esclarecer as possíveis causas das alterações encontradas e sabendo da relação do estresse oxidativo com possíveis modificações funcionais cardíacas, os corações foram avaliados em relação a sistemas pró-oxidantes e antioxidantes. Pela primeira vez, demonstramos aumento na concentração de MDA, caracterizando maior peroxidação lipídica, e diminuição da atividade da enzima SOD, localmente no coração. Narsaria et al., 2012 demonstraram que crianças infectadas por *Plasmodium falciparum* apresentaram redução de SOD e aumento de MDA no sangue, corroborando com os dados encontrados no presente trabalho, de que o estresse oxidativo é um fator que contribui para o desenvolvimento de sinais clínicos durante a malária grave (NARSARIA et al., 2012). De acordo com a literatura, as enzimas da família NOX estão diretamente envolvidas com doenças cardíacas, como insuficiência, hipertrofia, arritmias e isquemia (HINGTGEN et al., 2006; REILLY et al., 2011; STEVENSON et al., 2019). O presente trabalho demonstrou, através da inibição não seletiva de NOX, que a enzima está envolvida na alteração da função cardíaca durante a malária grave.

As NOX são famílias de enzimas que estão envolvidas nas respostas imunológicas. Por meio da produção de EROs, as NOX tem função de eliminar patógenos e participam da polarização de macrófagos em M1 ou M2, dependendo da isoforma da enzima que está ativada e do tipo de EROs que está sendo produzida, $\cdot\text{O}_2^-$ ou H_2O_2 (YI et al., 2012). As EROs derivadas das isoformas NOX1 e NOX4 estão envolvidas na ativação e infiltração de linfócitos T em modelos experimentais de aterosclerose associada a diabetes (DI MARCO et al., 2016). Durante a malária, de acordo com a literatura, a principal ERO produzida é o $\cdot\text{O}_2^-$, com o objetivo de auxiliar na eliminação do patógeno; mas, que em contrapartida, é responsável por danos teciduais significativos. Em modelos experimentais de malária cerebral, a inibição não seletiva da NOX em conjunto com um antiparasitário reduziu a quantidade de neurônios hipocâmpais com núcleo picnótico, demonstrando que a inibição da NOX tem ação neuroprotetora em MEMG cerebral (KUMAR et al., 2022).

Durante a malária grave ocorre aumento nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, e de citocina de ação anti-inflamatória IL-10 nos rins

de animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de animais que estava com malária e no plasma de pacientes infectados com *Plasmodium vivax* (ELIAS *et al.*, 2012; SALAZAR-CASTANON *et al.*, 2022; TOVAR ACERO *et al.*, 2022; WILAIRATANA *et al.*, 2022). Sabe-se que nos estágios iniciais da infecção, os neutrófilos são uma das primeiras células de defesa que irão destruir os protozoários e, para isto, são desencadeados diversos mecanismos inflamatórios, como a produção de EROs e o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (AITKEN *et al.*, 2018). No presente trabalho, demonstrou-se que, em animais infectados com *Plasmodium chabaudi* e que foram tratados com apocinina, houve aumento significativo de IL-1 β e IL-6 no coração, sugerindo que as EROs regulam positivamente as citocinas cardíacas durante a malária grave. Quando ocorrem danos ao miocárdio, como em quadros infecciosos, fragmentos de miosina ativam receptores de reconhecimento padrão (RRPs), como os receptores *Toll-like* (TLRs), que estão presentes em monócitos, desencadeiam também a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6, estresse oxidativo e a ativação de resposta do tipo células T auxiliares 17 (Th17), que podem ser correlacionadas com hipertrofia e insuficiência cardíacas (MYERS *et al.*, 2016).

As EROs produzidos pela NOX alteram a função de diversos canais iônicos e proteínas cardíacas. Os RyR2, por exemplo, são sensíveis a modificações no equilíbrio redox. Já foi demonstrado que durante o exercício físico, há aumento da expressão proteica de NOX2 e aumento da atividade dos canais de RyR2. Esse mecanismo de melhora da performance cardíaca mediado pela NOX2 em condições fisiológicas possui função cardioprotetora (SANCHEZ *et al.*, 2008; SANCHEZ *et al.*, 2005). Porém, em um contexto patológico, como por exemplo na malária grave, o aumento da contratilidade cardíaca está presente mesmo no basal, e não de forma adaptativa para o esforço, como ocorre no exercício. Nessa situação, as EROs produzidas em excesso afetam diversas moléculas envolvidas no acoplamento excitação-contração. Já foi descrito que canais de Ca²⁺ do tipo L, canais de Na⁺ dependentes de voltagem, RyR2, SERCA, trocador de Na⁺/Ca²⁺ e proteínas que compõem o sarcômero são sensíveis ao estresse oxidativo e níveis elevados de H₂O₂ ou \cdot O₂⁻ contribuem para disfunção diastólica ou sistólica (KOHLENER *et al.*, 2014; SAG *et al.*, 2013).

O aumento das concentrações de $\cdot\text{O}_2^-$ no citoplasma de cardiomiócitos pode desencadear a oxidação de diversas proteínas que participam do acoplamento excitação-contração. Em animais que não expressam a SOD1, enzima responsável pela dismutação de $\cdot\text{O}_2^-$, ocorre elevação da expressão da enzima NOX2, fibrose, hipertrofia cardíaca, que é acompanhada pela hipercontratibilidade sistólica associada com aumento da fosforilação de Tnl (VARSHNEY *et al.*, 2021).

Além das alterações nas mioproteínas, há trabalhos que demonstraram que o estresse oxidativo é responsável pela diminuição da atividade da SERCA devido a oxidação de resíduos de cisteína da proteína. O prejuízo na atividade da SERCA faz com que o Ca^{2+} permaneça com concentrações elevadas no citosol, comprometendo a captação do íon de volta ao retículo sarcoplasmático e desencadeando um coração hiperdinâmico (HAMSTRA *et al.*, 2020; SALIN RAJ *et al.*, 2019).

Estados hiperdinâmicos do coração ocorrem durante doenças infecciosas graves e são desencadeados por hipovolemia, diminuição da resistência vascular periférica e aumento na liberação de catecolaminas. Normalmente, o ventrículo esquerdo hiperdinâmico está associado a um pior prognóstico em pacientes que estão com quadros inflamatórios graves (JONES *et al.*, 2005; PAONESSA *et al.*, 2015; RAHMAN *et al.*, 2022). O coração em estado hiperdinâmico, caracterizado pelo aumento da frequência cardíaca e força de contração, é mais propenso a arritmias e isquemia, provocada pelo aumento do consumo de oxigênio pelos cardiomiócitos (KAWAGUCHI *et al.*, 2021). Já foi demonstrado que em arritmias induzidas por angiotensina-II (Ang-II) o estresse oxidativo irá causar a oxidação de enzimas chaves para função cardíaca, como proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CAMKII) e PKA, levando a fosforilação de moléculas-alvo como canais de iônicos e canais de RyR2, que irão aumentar as quantidades de Ca^{2+} no citosol do cardiomiócito (WAGNER *et al.*, 2014).

A inibição não seletiva da NOX com apocinina preveniu o desenvolvimento de hipercontratibilidade cardíaca em animais infectados com *Plasmodium chabaudi*. Importaneamente, a inibição da produção de ERO por apocinina não exacerbou a parasitemia ou piorou os sinais da infecção, mesmo a NOX de células fagocíticas sendo um mecanismo primário na eliminação de parasitos. Logo, a inibição de NOX é

um alvo específico para tratamento da hipercontratilidade cardíaca desencadeada pela malária. Trabalhos já demonstraram que a apocinina possui mecanismo de ação no qual impede a translocação das subunidades p47 e p67 do citosol para a membrana celular impedindo a ativação da enzima e a sua ação seria principalmente sobre a isoforma NOX2 (CHOI *et al.*, 2012; JAQUET *et al.*, 2009). Contudo, a apocinina apresenta algumas limitações como inibidor de NOX já descritas na literatura. Além de ter uma ação não seletiva, podendo também inibir diferentes isoformas de NOX, a apocinina tem ação antioxidante direta, através do sequestro de $\cdot\text{O}_2^-$, sem necessariamente inibir a NOX para reduzir estresse oxidativo (HEUMULLER *et al.*, 2008).

Em quadros inflamatórios e infecciosos há aumento da expressão e atividade da NOX2. Há aumento da expressão gênica e proteica NOX2 no hipocampo de animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e a enzima está associada a disfunções cognitivas e motoras durante a doença (KUMAR *et al.*, 2022). Apesar da maioria dos trabalhos apresentarem resultados importantes sobre as alterações cerebrais durante a malária grave, é essencial ressaltar que a doença é responsável por desencadear danos multissistêmicos que potencialmente são causados pelo estresse oxidativo. A NOX2 é expressa em diversas células do sistema cardiovascular. Ela é encontrada em cardiomiócitos, células endoteliais, fibroblastos e em células fagocíticas (TEUBER *et al.*, 2022). Confirmando os dados da literatura e os nossos dados sobre os efeitos da apocinina, os animais que não expressavam gp91^{phox}, a subunidade catalítica da NOX2, infectados com *Plasmodium chabaudi*, não apresentaram hipercontratilidade cardíaca e apresentaram resposta funcional semelhante aos animais controle, não infectados. Portanto, a NOX2 participa das alterações cardíacas durante a malária grave.

Atualmente as terapias antiparasitárias são eficazes para muitos casos de malária grave após admissão dos pacientes em serviços de saúde. Entretanto, já é descrito que o uso de terapias adjuvantes como, apocinina (KUMAR *et al.*, 2022), N-acetilcisteína (QUADROS GOMES *et al.*, 2015), vitamina C (QIN *et al.*, 2019), vitamina A (YAKOOB *et al.*, 2018) e vitamina E (SUZUKI *et al.*, 2018), melhoram o prognóstico e diminuir o danos em órgãos como cérebro, pulmão, rins e fígado. Entretanto, existem controvérsias relacionadas principalmente ao papel fundamental do estresse oxidativo

para a eliminação do protozoário. O presente trabalho demonstra que o estresse oxidativo cardíaco durante a malária grave causa alterações funcionais significativas, representadas pela hipercontratibilidade cardíaca. Estas modificações tão relevantes da função cardíaca são fatores desencadeadores de arritmias e isquemia, agravando o quadro de malária. Neste contexto, é importante o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas que auxiliem a ação de fármacos antiparasitários e possibilitem a inibição seletiva da NOX2, impedindo o desenvolvimento de alterações funcionais cardíacas, sem afetar o curso da doença e a resposta imunológica à malária grave.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a malária grave causa alterações cardíacas, caracterizadas por um estado hipercontrátil e hiper-responsivo ao estímulo farmacológico. A inibição da enzima NADPH oxidase (NOX) com apocinina diminuiu a inflamação e o dano oxidativo, prevenindo as alterações cardíacas funcionais. A ausência da enzima NOX2 impede que os animais com malária grave desenvolvam as alterações cardíacas e não altera o curso da infecção, confirmando o envolvimento da NOX2 para o desenvolvimento da hipercontratibilidade cardíaca por malária. Desta forma, a inibição de NOX2 é uma importante estratégia farmacológica para tratar o dano cardíaco em casos de malária grave.

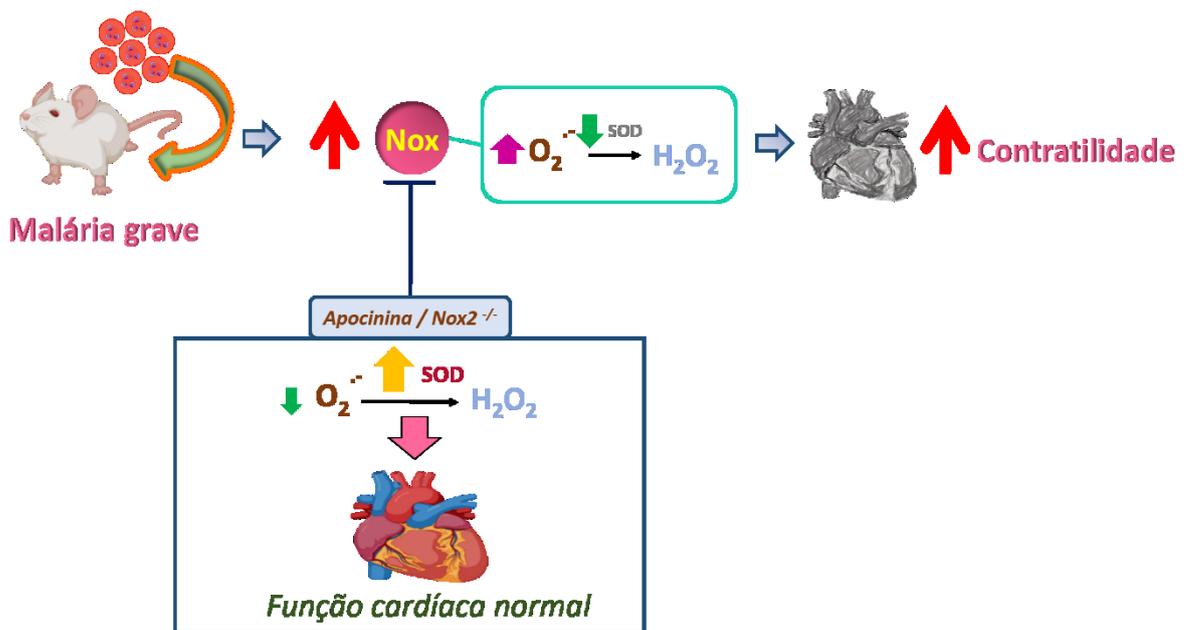


Figura 29: Envolvimento da NOX2 nas alterações cardíacas desenvolvida durante a MEMG.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 105, p. 121-126, 1984.

AGO, T.; KURODA, J.; PAIN, J.; FU, C. *et al.* Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. **Circ Res**, 106, n. 7, p. 1253-1264, Apr 16 2010.

AIRES, M. d. M. **Fisiologia**. 5^a ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN LTDA., 2018. 978-85-277-3401-1.

AITKEN, E. H.; ALEMU, A.; ROGERSON, S. J. Neutrophils and Malaria. **Front Immunol**, 9, p. 3005, 2018.

ALEGANA, V. A.; MACHARIA, P. M.; MUCHIRI, S.; MUMO, E. *et al.* Plasmodium falciparum parasite prevalence in East Africa: Updating data for malaria stratification. **PLOS Glob Public Health**, 1, n. 12, p. e0000014, Dec 7 2021.

ALENCAR-FILHO, A. C.; FERREIRA, J.; SALINAS, J. L.; FABBRI, C. *et al.* Cardiovascular changes in patients with non-severe Plasmodium vivax malaria. **Int J Cardiol Heart Vasc**, 11, p. 12-16, Jun 2016.

ALENCAR FILHO, A. C.; LACERDA, M. V.; OKOSHI, K.; OKOSHI, M. P. Malaria and vascular endothelium. **Arq Bras Cardiol**, 103, n. 2, p. 165-169, Aug 2014.

ANDEN, N.-E. **Adrenergic Activators and Inhibitors** 1980. (Handbook of Experimental Pharmacology 978-3-642-67507-2.

BAIA-DA-SILVA, D. C.; BRITO-SOUSA, J. D.; RODOVALHO, S. R.; PETERKA, C. *et al.* Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 52, p. e20180542, Mar 7 2019.

BARBER, B. E.; GRIGG, M. J.; COOPER, D. J.; VAN SCHALKWYK, D. A. *et al.* Clinical management of Plasmodium knowlesi malaria. **Adv Parasitol**, 113, p. 45-76, 2021.

BAROUCH, L. A.; HARRISON, R. W.; SKAF, M. W.; ROSAS, G. O. *et al.* Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. **Nature**, 416, n. 6878, p. 337-339, Mar 21 2002.

BELL, R. M.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. **J Mol Cell Cardiol**, 50, n. 6, p. 940-950, Jun 2011.

BERNABEU, M.; HOWARD, C.; ZHENG, Y.; SMITH, J. D. Bioengineered 3D Microvessels for Investigating Plasmodium falciparum Pathogenesis. **Trends Parasitol**, 37, n. 5, p. 401-413, May 2021.

BERNABEU, M.; SMITH, J. D. EPCR and Malaria Severity: The Center of a Perfect Storm. **Trends Parasitol**, 33, n. 4, p. 295-308, Apr 2017.

BREJT, J. A.; GOLIGHTLY, L. M. Severe malaria: update on pathophysiology and treatment. **Curr Opin Infect Dis**, 32, n. 5, p. 413-418, Oct 2019.

BRODDE, O. E.; BRUCK, H.; LEINWEBER, K.; SEYFARTH, T. Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. **Basic Res Cardiol**, 96, n. 6, p. 528-538, Nov 2001.

BRUCE-CHWATT, L. J. Alphonse Laveran's discovery 100 years ago and today's global fight against malaria. **J R Soc Med**, 74, n. 7, p. 531-536, Jul 1981.

CGPNM/DEVIT/SVS/MS, M. d. S.-. Malária Brasil. 2022.

CHOI, S. H.; AID, S.; KIM, H. W.; JACKSON, S. H. et al. Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation.. **J. Neurochem.**, 120, n. 2, p. 292-301, Jan 2012.

COBAN, C.; LEE, M. S. J.; ISHII, K. J. Tissue-specific immunopathology during malaria infection. **Nat Rev Immunol**, 18, n. 4, p. 266-278, Apr 2018.

COLOMBA, C.; TRIZZINO, M.; GIOE, C.; COELHO, F. *et al.* Malaria and the heart: Two rare case reports of Plasmodium falciparum associated pericarditis. **J Vector Borne Dis**, 54, n. 4, p. 372-374, Oct-Dec 2017.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasit Vectors**, 3, n. 1, p. 5, Feb 1 2010.

CRAIG, A. G.; GRAU, G. E.; JANSE, C.; KAZURA, J. W. *et al.* The role of animal models for research on severe malaria. **PLoS Pathog**, 8, n. 2, p. e1002401, Feb 2012.

DAY, N. P.; HIEN, T. T.; SCHOLLAARDT, T.; LOC, P. P. *et al.* The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. **J Infect Dis**, 180, n. 4, p. 1288-1297, Oct 1999.

DE MENEZES, M. N.; SALLES, E. M.; VIEIRA, F.; AMARAL, E. P. *et al.* IL-1alpha promotes liver inflammation and necrosis during blood-stage Plasmodium chabaudi malaria. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 7575, May 20 2019.

DI MARCO, E.; GRAY, S. P.; CHEW, P.; KENNEDY, K. *et al.* Differential effects of NOX4 and NOX1 on immune cell-mediated inflammation in the aortic sinus of diabetic ApoE^{-/-} mice. **Clin Sci (Lond)**, 130, n. 15, p. 1363-1374, Aug 1 2016.

DYAVANAPALLI, J. Novel approaches to restore parasympathetic activity to the heart in cardiorespiratory diseases. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 319, n. 6, p. H1153-H1161, Dec 1 2020.

EL-ASWAD, B. E. W.; SONBOL, A. A.; MOHARM, I. M.; EL-REFAI, S. A. *et al.* Circulating endothelial cells in severe Plasmodium falciparum infection. **Parasitol Int**, 72, p. 101926, Oct 2019.

ELIAS, R. M.; CORREA-COSTA, M.; BARRETO, C. R.; SILVA, R. C. *et al.* Oxidative stress and modification of renal vascular permeability are associated with acute kidney injury during P. berghei ANKA infection. **PLoS One**, 7, n. 8, p. e44004, 2012.

FAJARDO, G.; ZHAO, M.; URASHIMA, T.; FARAHANI, S. *et al.* Deletion of the beta2-adrenergic receptor prevents the development of cardiomyopathy in mice. **J Mol Cell Cardiol**, 63, p. 155-164, Oct 2013.

FERREIRA, F. C.; ALVES, L. G. M.; JAGER, G. B.; FRANZINI, L. D. *et al.* Molecular and pathological investigations of Plasmodium parasites infecting striped forest whiptail lizards (Kentropyx calcarata) in Brazil. **Parasitol Res**, 119, n. 8, p. 2631-2640, Aug 2020.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malar J**, 15, n. 1, p. 284, May 20 2016.

FRANCISCHETTI, I. M.; GORDON, E.; BIZZARRO, B.; GERA, N. *et al.* Tempol, an intracellular antioxidant, inhibits tissue factor expression, attenuates dendritic cell function, and is partially protective in a murine model of cerebral malaria. **PLoS One**, 9, n. 2, p. e87140, 2014.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Cross-Talk between NADPH Oxidase and Mitochondria: Role in ROS Signaling and Angiogenesis. **Cells**, 9, n. 8, Aug 6 2020.

GILLRIE, M. R.; HO, M. Dynamic interactions of Plasmodium spp. with vascular endothelium. **Tissue Barriers**, 5, n. 1, p. e1268667, Jan 2 2017.

GOYAL, M.; ALAM, A.; BANDYOPADHYAY, U. Redox regulation in malaria: current concepts and pharmacotherapeutic implications. **Curr Med Chem**, 19, n. 10, p. 1475-1503, 2012.

GUPTA, S.; GAZENDAM, N.; FARINA, J. M.; SALDARRIAGA, C. *et al.* Malaria and the Heart: JACC State-of-the-Art Review. **J Am Coll Cardiol**, 77, n. 8, p. 1110-1121, Mar 2 2021.

GUTTERY, D. S.; ZEESHAN, M.; FERGUSON, D. J. P.; HOLDER, A. A. *et al.* Division and Transmission: Malaria Parasite Development in the Mosquito. **Annu Rev Microbiol**, 76, p. 113-134, Sep 8 2022.

- HAMSTRA, S. I.; WHITLEY, K. C.; BARANOWSKI, R. W.; KURGAN, N. *et al.* The role of phospholamban and GSK3 in regulating rodent cardiac SERCA function. **Am J Physiol Cell Physiol**, 319, n. 4, p. C694-C699, Oct 1 2020.
- HANBOONKUNUPAKARN, B.; TARNING, J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; CHOTIVANICH, K. Artemisinin resistance and malaria elimination: Where are we now? **Front Pharmacol**, 13, p. 876282, 2022.
- HARVEY, R. D. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cardiovascular function. **Handb Exp Pharmacol**, n. 208, p. 299-316, 2012.
- HEUMULLER, S.; WIND, S.; BARBOSA-SICARD, E.; SCHMIDT, H. H. *et al.* Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, 51, n. 2, p. 211-217, Feb 2008.
- HEUSCHEN, A. K.; LU, G.; RAZUM, O.; ABDUL-MUMIN, A. *et al.* Public health-relevant consequences of the COVID-19 pandemic on malaria in sub-Saharan Africa: a scoping review. **Malar J**, 20, n. 1, p. 339, Aug 11 2021.
- HINGTGEN, S. D.; TIAN, X.; YANG, J.; DUNLAY, S. M. *et al.* Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Physiol Genomics**, 26, n. 3, p. 180-191, Aug 16 2006.
- HOLM, A. E.; GOMES, L. C.; MARINHO, C. R. F.; SILVESTRE, O. M. *et al.* Prevalence of Cardiovascular Complications in Malaria: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Am J Trop Med Hyg**, 104, n. 5, p. 1643-1650, Mar 15 2021.
- HOTEZ, P. J.; DAMANIA, A.; BOTTAZZI, M. E. Central Latin America: Two decades of challenges in neglected tropical disease control. **PLoS Negl Trop Dis**, 14, n. 3, p. e0007962, Mar 2020.
- JAIN, K.; CHAKRAPANI, M. Acute myocardial infarction in a hospital cohort of malaria. **J Glob Infect Dis**, 2, n. 1, p. 72-73, Jan 2010.
- JARDIN, F.; FOURME, T.; PAGE, B.; LOUBIERES, Y. *et al.* Persistent preload defect in severe sepsis despite fluid loading: A longitudinal echocardiographic study in patients with septic shock. **Chest**, 116, n. 5, p. 1354-1359, Nov 1999.
- JAQUET, V.; SCAPOZZA, L.; CLARK, R. A.; KRAUSE, K. H. *et al.* Small-molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets. **Antioxid Redox Signal**, 11, n. 10, p. 2535-2552, Oct 2009.
- JENSEN, A. R.; ADAMS, Y.; HVIID, L. Cerebral Plasmodium falciparum malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. **Immunol Rev**, 293, n. 1, p. 230-252, Jan 2020.

JONES, A. E.; CRADDOCK, P. A.; TAYAL, V. S.; KLINE, J. A. Diagnostic accuracy of left ventricular function for identifying sepsis among emergency department patients with nontraumatic symptomatic undifferentiated hypotension. **Shock**, 24, n. 6, p. 513-517, Dec 2005.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Tradução FONSECA, A. V. 12^a ed. 2014. 1228 p p. 978-85-8055-226-3.

KAWAGUCHI, S.; OKADA, M. Cardiac Metabolism in Sepsis. **Metabolites**, 11, n. 12, Dec 6 2021.

KEMI, O. J.; ELLINGSEN, O.; CECI, M.; GRIMALDI, S. *et al.* Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. **J Mol Cell Cardiol**, 43, n. 3, p. 354-361, Sep 2007.

KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA, F.; INOUE, T.; SHINTANI, S. A.; OYAMA, K. *et al.* Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. **J Physiol Sci**, 64, n. 4, p. 221-232, Jul 2014.

KOHLER, A. C.; SAG, C. M.; MAIER, L. S. Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. **J Mol Cell Cardiol**, 73, p. 92-102, Aug 2014.

KULANDAVELU, S.; HARE, J. M. Alterations in beta3-adrenergic cardiac innervation and nitric oxide signaling in heart failure. **J Am Coll Cardiol**, 59, n. 22, p. 1988-1990, May 29 2012.

KUMAR, S. P.; BABU, P. P. NADPH Oxidase: a Possible Therapeutic Target for Cognitive Impairment in Experimental Cerebral Malaria. **Mol Neurobiol**, 59, n. 2, p. 800-820, Feb 2022.

LAMB, T. J.; LANGHORNE, J. The severity of malarial anaemia in *Plasmodium chabaudi* infections of BALB/c mice is determined independently of the number of circulating parasites. **Malar J**, 7, p. 68, Apr 25 2008.

MARRELLI, M. T.; BROTTTO, M. The effect of malaria and anti-malarial drugs on skeletal and cardiac muscles. **Malar J**, 15, n. 1, p. 524, Nov 2 2016.

MASSION, P. B.; BALLIGAND, J. L. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. **J Physiol**, 546, n. Pt 1, p. 63-75, Jan 1 2003.

MATSUSHIMA, S.; KURODA, J.; AGO, T.; ZHAI, P. *et al.* Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy. **Circ Res**, 112, n. 4, p. 651-663, Feb 15 2013.

MATSUSHIMA, S.; KURODA, J.; ZHAI, P.; LIU, T. *et al.* Tyrosine kinase FYN negatively regulates NOX4 in cardiac remodeling. **J Clin Invest**, 126, n. 9, p. 3403-3416, Sep 1 2016.

MISHRA, S. K.; BEHERA, P. K.; SATPATHI, S. Cardiac involvement in malaria: an overlooked important complication. **J Vector Borne Dis**, 50, n. 3, p. 232-235, Sep 2013.

MONROE, A.; WILLIAMS, N. A.; OGOMA, S.; KAREMA, C. *et al.* Reflections on the 2021 World Malaria Report and the future of malaria control. **Malar J**, 21, n. 1, p. 154, May 27 2022.

MOXON, C. A.; GIBBINS, M. P.; MCGUINNESS, D.; MILNER, D. A., Jr. *et al.* New Insights into Malaria Pathogenesis. **Annu Rev Pathol**, 15, p. 315-343, Jan 24 2020.

MUNGKALASUT, P.; KIATAMORNRAK, P.; JUGNAM-ANG, W.; KRUDSOOD, S. *et al.* Haematological profile of malaria patients with G6PD and PKLR variants (erythrocytic enzymopathies): a cross-sectional study in Thailand. **Malar J**, 21, n. 1, p. 250, Aug 30 2022.

MYERS, J. M.; COOPER, L. T.; KEM, D. C.; STAVRAKIS, S. *et al.* Cardiac myosin-Th17 responses promote heart failure in human myocarditis. **JCI Insight**, 1, n. 9, Jun 16 2016.

NAGARAJ, V. A.; SUNDARAM, B.; VARADARAJAN, N. M.; SUBRAMANI, P. A. *et al.* Malaria parasite-synthesized heme is essential in the mosquito and liver stages and complements host heme in the blood stages of infection. **PLoS Pathog**, 9, n. 8, p. e1003522, 2013.

NARSARIA, N.; MOHANTY, C.; DAS, B. K.; MISHRA, S. P. *et al.* Oxidative stress in children with severe malaria. **J Trop Pediatr**, 58, n. 2, p. 147-150, Apr 2012.

NGAI, M.; HAWKES, M. T.; ERICE, C.; WECKMAN, A. M. *et al.* Intestinal injury in Ugandan children hospitalized with malaria. **J Infect Dis**, Aug 9 2022.

NISHANTH, G.; SCHLUTER, D. Blood-Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. **Trends Parasitol**, 35, n. 7, p. 516-528, Jul 2019.

NIU, X.; WATTS, V. L.; CINGOLANI, O. H.; SIVAKUMARAN, V. *et al.* Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase. **J Am Coll Cardiol**, 59, n. 22, p. 1979-1987, May 29 2012.

OLEJNICKOVA, V.; NOVAKOVA, M.; PROVAZNIK, I. Isolated heart models: cardiovascular system studies and technological advances. **Med Biol Eng Comput**, 53, n. 7, p. 669-678, Jul 2015.

PANDAY, A.; SAHOO, M. K.; OSORIO, D.; BATRA, S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cell Mol Immunol**, 12, n. 1, p. 5-23, Jan 2015.

PAONESSA, J. R.; BRENNAN, T.; PIMENTEL, M.; STEINHAUS, D. *et al.* Hyperdynamic left ventricular ejection fraction in the intensive care unit. **Crit Care**, 19, p. 288, Aug 7 2015.

PATTARADILOKRAT, S.; WU, J.; XU, F.; SU, X. Z. The origins, isolation, and biological characterization of rodent malaria parasites. **Parasitol Int**, 91, p. 102636, Dec 2022.

PERCARIO, S.; MOREIRA, D. R.; GOMES, B. A.; FERREIRA, M. E. *et al.* Oxidative stress in malaria. **Int J Mol Sci**, 13, n. 12, p. 16346-16372, Dec 3 2012.

PRASANNACHANDRA, V. D. S. a. B. D. S. Comparative study on lipid peroxidation and antioxidant vitamins e and cin falciparum and vivax malarial **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 21, p. 103 - 106, 2006.

PRICE, R. N.; COMMONS, R. J.; BATTLE, K. E.; THRIEMER, K. *et al.* Plasmodium vivax in the Era of the Shrinking P. falciparum Map. **Trends Parasitol**, 36, n. 6, p. 560-570, Jun 2020.

QIN, X.; LIU, J.; DU, Y.; LI, Y. *et al.* Different doses of vitamin C supplementation enhances the Th1 immune response to early Plasmodium yoelii 17XL infection in BALB/c mice. **Int Immunopharmacol**, 70, p. 387-395, May 2019.

QUADROS GOMES, B. A.; DA SILVA, L. F.; QUADROS GOMES, A. R.; MOREIRA, D. R. *et al.* N-acetyl cysteine and mushroom Agaricus sylvaticus supplementation decreased parasitaemia and pulmonary oxidative stress in a mice model of malaria. **Malar J**, 14, p. 202, May 15 2015.

RAHMAN, A.; RUGE, M.; HLEPAS, A.; NAIR, G. *et al.* Hyperdynamic left ventricular ejection fraction is associated with higher mortality in COVID-19 patients. **Am Heart J Plus**, 14, p. 100134, Feb 2022.

REILLY, S. N.; JAYARAM, R.; NAHAR, K.; ANTONIADES, C. *et al.* Atrial sources of reactive oxygen species vary with the duration and substrate of atrial fibrillation: implications for the antiarrhythmic effect of statins. **Circulation**, 124, n. 10, p. 1107-1117, Sep 6 2011.

RIBEIRO DE CASTRO DUARTE, A. M.; FERNANDES, L. N.; SILVA, F. S.; SICCHI, I. L. *et al.* Complexity of malaria transmission dynamics in the Brazilian Atlantic Forest. **Curr Res Parasitol Vector Borne Dis**, 1, p. 100032, 2021.

- RIFKIND, J. M.; MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. **Front Physiol**, 5, p. 500, 2014.
- ROGERSON, S. J.; GRAU, G. E.; HUNT, N. H. The microcirculation in severe malaria. **Microcirculation**, 11, n. 7, p. 559-576, Oct-Nov 2004.
- SAG, C. M.; WAGNER, S.; MAIER, L. S. Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes. **Free Radic Biol Med**, 63, p. 338-349, Oct 2013.
- SALAZAR-CASTANON, V. H.; JUAREZ-AVELAR, I.; LEGORRETA-HERRERA, M.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to immunopathogenesis during *Plasmodium yoelii* 17XL infection. **Front Cell Infect Microbiol**, 12, p. 968422, 2022.
- SALIN RAJ, P.; SWAPNA, S. U. S.; RAGHU, K. G. High glucose induced calcium overload via impairment of SERCA/PLN pathway and mitochondrial dysfunction leads to oxidative stress in H9c2 cells and amelioration with ferulic acid. **Fundam Clin Pharmacol**, 33, n. 4, p. 412-425, Aug 2019.
- SAM, J.; SHAMSUSAH, N. A.; ALI, A. H.; HOD, R. *et al.* Prevalence of simian malaria among macaques in Malaysia (2000-2021): A systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, 16, n. 7, p. e0010527, Jul 2022.
- SANCHEZ, G.; ESCOBAR, M.; PEDROZO, Z.; MACHO, P. *et al.* Exercise and tachycardia increase NADPH oxidase and ryanodine receptor-2 activity: possible role in cardioprotection. **Cardiovasc Res**, 77, n. 2, p. 380-386, Jan 15 2008.
- SANCHEZ, G.; PEDROZO, Z.; DOMENECH, R. J.; HIDALGO, C. *et al.* Tachycardia increases NADPH oxidase activity and RyR2 S-glutathionylation in ventricular muscle. **J Mol Cell Cardiol**, 39, n. 6, p. 982-991, Dec 2005.
- SATO, S. Plasmodium-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. **J Physiol Anthropol**, 40, n. 1, p. 1, Jan 7 2021.
- SAÚDE, M. d. Guia de tratamento da malária no Brasil. SAÚDE, S. d. V. e. 2020.
- SAÚDE, M. d. Boletim Epidemiológico, 2021. SAÚDE, S. d. V. e. 2021a.
- SAÚDE, M. d. **Mapa de risco por município de infecção, Brasil, 2021.** 2021b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria>. Acesso em: 09/10/2022.
- SAÚDE, S. d. v. e. Mortalidade infantil no Brasil. SAÚDE, M. d. 52 2021.

SCIARRETTA, S.; ZHAI, P.; SHAO, D.; ZABLOCKI, D. *et al.* Activation of NADPH oxidase 4 in the endoplasmic reticulum promotes cardiomyocyte autophagy and survival during energy stress through the protein kinase RNA-activated-like endoplasmic reticulum kinase/eukaryotic initiation factor 2 α /activating transcription factor 4 pathway. **Circ Res**, 113, n. 11, p. 1253-1264, Nov 8 2013.

SEQUEIRA, V.; VAN DER VELDEN, J. The Frank-Starling Law: a jigsaw of titin proportions. **Biophys Rev**, 9, n. 3, p. 259-267, Jun 2017.

SIAO, M. C.; BORNER, J.; PERKINS, S. L.; DEITSCH, K. W. *et al.* Evolution of Host Specificity by Malaria Parasites through Altered Mechanisms Controlling Genome Maintenance. **mBio**, 11, n. 2, Mar 17 2020.

SIMPLICIO, J. A.; DO VALE, G. T.; GONZAGA, N. A.; LEITE, L. N. *et al.* Reactive oxygen species derived from NAD(P)H oxidase play a role on ethanol-induced hypertension and endothelial dysfunction in rat resistance arteries. **J Physiol Biochem**, 73, n. 1, p. 5-16, Feb 2017.

SIMPLICIO, J. A.; RESSTEL, L. B.; TIRAPELLI, D. P.; D'ORLEANS-JUSTE, P. *et al.* Contribution of oxidative stress and prostanoids in endothelial dysfunction induced by chronic fluoxetine treatment. **Vascul Pharmacol**, 73, p. 124-137, Oct 2015.

SPUDICH, J. A. Hypertrophic and dilated cardiomyopathy: four decades of basic research on muscle lead to potential therapeutic approaches to these devastating genetic diseases. **Biophys J**, 106, n. 6, p. 1236-1249, Mar 18 2014.

STEPHENS, R.; CULLETON, R. L.; LAMB, T. J. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. **Trends Parasitol**, 28, n. 2, p. 73-82, Feb 2012.

STEVENSON, M. D.; CANUGOVI, C.; VENDROV, A. E.; HAYAMI, T. *et al.* NADPH Oxidase 4 Regulates Inflammation in Ischemic Heart Failure: Role of Soluble Epoxide Hydrolase. **Antioxid Redox Signal**, 31, n. 1, p. 39-58, Jul 1 2019.

STORM, J.; JESPERSEN, J. S.; SEYDEL, K. B.; SZESTAK, T. *et al.* Cerebral malaria is associated with differential cytoadherence to brain endothelial cells. **EMBO Mol Med**, 11, n. 2, Feb 2019.

SUZUKI, H.; KUME, A.; HERBAS, M. S. Potential of Vitamin E Deficiency, Induced by Inhibition of α -Tocopherol Efflux, in Murine Malaria Infection. **Int J Mol Sci**, 20, n. 1, Dec 24 2018.

TAYLOR, J. P.; TSE, H. M. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases. **Redox Biol**, 48, p. 102159, Dec 2021.

TAYLOR, T. E.; FU, W. J.; CARR, R. A.; WHITTEN, R. O. *et al.* Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. **Nat Med**, 10, n. 2, p. 143-145, Feb 2004.

TEUBER, J. P.; ESSANDOH, K.; HUMMEL, S. L.; MADAMANCHI, N. R. *et al.* NADPH Oxidases in Diastolic Dysfunction and Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. **Antioxidants (Basel)**, 11, n. 9, Sep 16 2022.

TOVAR ACERO, C.; RAMIREZ-MONTOYA, J.; VELASCO, M. C.; AVILES-VERGARA, P. A. *et al.* IL-4, IL-10, CCL2 and TGF-beta as potential biomarkers for severity in Plasmodium vivax malaria. **PLoS Negl Trop Dis**, 16, n. 9, p. e0010798, Sep 2022.

TURNER, G. D.; MORRISON, H.; JONES, M.; DAVIS, T. M. *et al.* An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. **Am J Pathol**, 145, n. 5, p. 1057-1069, Nov 1994.

VAN DER POL, A.; VAN GILST, W. H.; VOORS, A. A.; VAN DER MEER, P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **Eur J Heart Fail**, 21, n. 4, p. 425-435, Apr 2019.

VARSHNEY, R.; RANJIT, R.; CHIAO, Y. A.; KINTER, M. *et al.* Myocardial Hypertrophy and Compensatory Increase in Systolic Function in a Mouse Model of Oxidative Stress. **Int J Mol Sci**, 22, n. 4, Feb 18 2021.

VERMOT, A.; PETIT-HARTLEIN, I.; SMITH, S. M. E.; FIESCHI, F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. **Antioxidants (Basel)**, 10, n. 6, Jun 1 2021.

VUONG, P. N.; RICHARD, F.; SNOUNOU, G.; COQUELIN, F. *et al.* Development of irreversible lesions in the brain, heart and kidney following acute and chronic murine malaria infection. **Parasitology**, 119 (Pt 6), p. 543-553, Dec 1999.

WAGNER, S.; DANTZ, C.; FLEBBE, H.; AZIZIAN, A. *et al.* NADPH oxidase 2 mediates angiotensin II-dependent cellular arrhythmias via PKA and CaMKII. **J Mol Cell Cardiol**, 75, p. 206-215, Oct 2014.

WANG, S.; ZIMAN, B.; BODI, I.; RUBIO, M. *et al.* Dilated cardiomyopathy with increased SR Ca²⁺ loading preceded by a hypercontractile state and diastolic failure in the alpha(1C)TG mouse. **PLoS One**, 4, n. 1, p. e4133, 2009.

WARD, K. E.; FIDOCK, D. A.; BRIDGFORD, J. L. Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies. **Curr Opin Microbiol**, 69, p. 102193, Oct 2022.

WEIL, A. S.; HERNANDEZ, G. P.; SUSLOW, T.; QUIRIN, M. Implicit Affect and Autonomous Nervous System Reactions: A Review of Research Using the Implicit Positive and Negative Affect Test. **Front Psychol**, 10, p. 1634, 2019.

WENNICKE, K.; DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; WICHMANN, D.; BRATTIG, N. W. *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-induced cardiac myocyte death might contribute to the fatal outcome of Plasmodium falciparum malaria. **Apoptosis**, 13, n. 7, p. 857-866, Jul 2008.

WHITE, N. J. Severe malaria. **Malar J**, 21, n. 1, p. 284, Oct 6 2022.

WHITTY, C. J.; ROWLAND, M.; SANDERSON, F.; MUTABINGWA, T. K. Malaria. **BMJ**, 325, n. 7374, p. 1221-1224, Nov 23 2002.

WHO. **World malaria report**. 2021

WILAIRATANA, P.; MALA, W.; KOTEPUI, M.; KOTEPUI, K. U. Alteration of Blood Lactate Levels in Severe Falciparum Malaria: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Biology (Basel)**, 10, n. 11, Oct 22 2021.

WILAIRATANA, P.; MALA, W.; MILANEZ, G. J.; MASANGKAY, F. R. *et al.* Increased interleukin-6 levels associated with malaria infection and disease severity: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, 12, n. 1, p. 5982, Apr 8 2022.

YAKOOB, M. Y.; QADIR, M.; HANY, O. E. Vitamin A Supplementation for Prevention and Treatment of Malaria during Pregnancy and Childhood: A Systematic Review and Meta-analysis. **J Epidemiol Glob Health**, 8, n. 1-2, p. 20-28, Dec 2018.

YEO, T. W.; LAMPAH, D. A.; GITAWATI, R.; TJITRA, E. *et al.* Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. **J Exp Med**, 204, n. 11, p. 2693-2704, Oct 29 2007.

YI, L.; LIU, Q.; ORANDLE, M. S.; SADIQ-ALI, S. *et al.* p47(phox) directs murine macrophage cell fate decisions. **Am J Pathol**, 180, n. 3, p. 1049-1058, Mar 2012.

YOUN, J. Y.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; CHEN, H. *et al.* Oxidative stress in atrial fibrillation: an emerging role of NADPH oxidase. **J Mol Cell Cardiol**, 62, p. 72-79, Sep 2013.

ZHANG, L.; LI, F.; ZHI, G.; ZHANG, B. *et al.* NADPH oxidase contributes to the left ventricular dysfunction induced by sinoaortic denervation in rats. **Free Radic Res**, 49, n. 1, p. 57-66, Jan 2015.

ZHANG, M.; PROSSER, B. L.; BAMBOYE, M. A.; GONDIM, A. N. S. *et al.* Contractile Function During Angiotensin-II Activation: Increased Nox2 Activity

Modulates Cardiac Calcium Handling via Phospholamban Phosphorylation. **J Am Coll Cardiol**, 66, n. 3, p. 261-272, Jul 21 2015.

ZHANG, Y.; MURUGESAN, P.; HUANG, K.; CAI, H. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. **Nat Rev Cardiol**, 17, n. 3, p. 170-194, Mar 2020.