

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

YARA CAROLLO BLANCO

**“EFEITOS DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *PLASMODIUM SPP.*”**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre em
Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

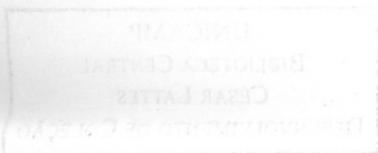
Campinas, 28 de março de 2007

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA:	T/UNICAMP
	B598e
V	Ex.
TOMBO BUCL	73.374
PROC	16.145-07
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	11/07/07
BIB-ID	43 00 44

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

B598e	<p>Blanco, Yara Carollo Efeitos da oxigenação hiperbárica na infecção experimental por <i>Plasmodium</i> spp. / Yara Carollo Blanco. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Fabio Trindade Maranhão Costa. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Oxigenação hiperbárica. 2. <i>Plasmodium</i>. 3. Malária cerebral. 4. Neuroproteção. I. Costa, Fabio Trindade Maranhão. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p align="right">(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Effects of hiperbaric oxigenation in *Plasmodium* spp experimental infection.
Palavras-chave em inglês: Hyperbaric oxygenation; *Plasmodium*; Cerebral malaria; Neuroprotection.
Titulação: Mestre em Parasitologia.
Banca examinadora: Fabio Trindade Maranhão Costa, Selma Giorgio, Francesco Langone.
Data da defesa: 28/03/2007.
Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.



Campinas, 28 de fevereiro de .2007.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fabio Trindade por ter me dado apoio, por ter investido no meu trabalho, por ter acreditado em mim e por ter me dado a chance de realizar mais este passo da minha formação.

A professora Selma Giorgio, por permitir que este trabalho se realizasse, pelas orientações e pela motivação.

BANCA EXAMINADORA

Aos professores Selma Giorgio, Francesco Langone, Urara Kawazoe e Fernanda Ramos Gadelha pela participação na banca examinadora e pelas sugestões.

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

(Orientador)

Assinatura

Profa. Dra. Selma Giorgio.....

Assinatura

Prof. Dr. Francesco Langone.....

Assinatura

Profa. Dra. Urara Kawazoe.....

Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha....

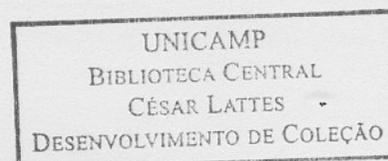
Assinatura

A meus companheiros de laboratório Bruna, Rafael (Joca), Juliana e Stefanie, pela amizade, pelas discussões, pelos ensinamentos; em especial a Stefanie que desde o primeiro dia tem me ajudado e me incentivado muito.

Aos alunos da professora Selma: Adriana, Diana, Maira e principalmente ao Wagner que me ensinou muito sobre RBO.

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e a CAPES por possibilitar a realização desse trabalho.

200729577



AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fabio Costa por ter me dado apoio, por ter investido no meu trabalho, por ter acreditado em mim e me dado a chance de realizar mais este passo da minha formação.

À professora Selma Giorgio, por permitir que este trabalho se realizasse, pelas sugestões, pelo apoio, e pela motivação.

Aos professores: Selma Giorgio, Francesco Langone, Urara Kawazoe e Fernanda Ramos Gadelha pela participação na banca examinadora e pelas sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia pelo apoio, principalmente ao Ivo, João e ao Nilson que sempre me ajudaram muito, principalmente nas trocas dos cilindros de oxigênio!!!! À Andréia e ao Marco que tiraram minhas inúmeras dúvidas, e que sempre me ajudaram muito!

A meus pais por terem me dado a vida, por seu amor, carinho e dedicação por possibilitarem tudo o que tenho e o que sou hoje.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração e felicidade que trazem a minha vida.

A meu irmão, que nesses últimos anos, além de irmão tem sido um verdadeiro amigo, muito obrigada por seu apoio, por seu carinho e pela sua atenção.

A meu marido, que tem me agüentado nos momentos difíceis, que passou inúmeros finais de semanas me ajudando com meus camundongos; obrigado pela compreensão, pelo amor e por me fazer feliz!!

A meus companheiros de laboratório Bruna, Rafael (Jaca), Juliana e Stefanie, pela amizade, pelas discussões, pelos ensinamentos; em especial à Stefanie que desde o primeiro dia tem me ajudado e me ensinado muito.

Aos alunos da professora Selma; Adriana, Diana, Maira e principalmente ao Wagner que me ensinou muito sobre HBO .

A Universidade estadual de Campinas (UNICAMP) e a CAPES por possibilitar a realização desse trabalho.

RESUMO

A malária é sem dúvida a doença parasitária mais importante do mundo, infectando 300-500 milhões de pessoas e levando a óbito cerca de 1-2 milhões de indivíduos anualmente. Malária cerebral (MC) é o mais importante tipo de complicação nas infecções maláricas. MC é uma síndrome multifatorial, entretanto sua patogênese ainda não foi totalmente elucidada. Diversos estudos mostram a adesão de eritrócitos infectados (EI) no endotélio microvascular do hospedeiro. No entanto, várias evidências indicam que um desbalanço da resposta imune e da homeostase, acarretando numa elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias também desempenham um papel importante na patogênese da MC. O modelo utilizando camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) parece ser o que mais se assemelha a MC humana, já que em ambos casos ocorre um aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias, da destruição neuronal, da hemorragia cerebral e da concentração de lactato.

A terapia de oxigenação hiperbárica (HBO) tem sido amplamente utilizada como potencializador de cicatrização e contra microrganismos anaeróbicos. No entanto, nos últimos anos, diversos estudos têm mostrado que o oxigênio pressurizado é capaz de proteger contra a destruição da barreira hemato-encefálica (BHE), inibir a destruição neuronal, reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão ICAM-1, receptor leucocitário, e de EI.

Neste estudo, avaliamos os efeitos da HBO na prevenção dos sintomas da MC em camundongos infectados com PbA e nos eritrócitos expostos diretamente ao oxigênio hiperbárico. A utilização do oxigênio hiperbárico mostrou-se capaz de reduzir significativamente a taxa de mortalidade associada à malária cerebral experimental, assim como uma redução da queda da temperatura corporal e dos níveis de parasitemia. Além disso, nossos resultados demonstram que a terapia com oxigênio hiperbárico impede a

destruição da BHE. Testes *In vitro* mostraram que a exposição direta de eritrócitos sadios e de eritrócitos infectados (EI), á HBO não é tóxica e nem capaz de alterar a viabilidade e infectividade de EI. Por último, mostramos que o tratamento com HBO realizado após o quarto dia de infecção (quando a parasitemia já é patente), retarda o aparecimento dos sintomas neurológicos da malária cerebral e morte associada.

ABSTRACT

Malaria is the world's most nefarious infectious disease, affecting 300-500 million people and leads to death of 1-2 million individuals per year. Cerebral malaria (CM) is the most serious complications that might occur during a malarial infection. CM is a multifactorial syndrome; however its pathogenesis is still a matter of debate. Several studies show that in adhesion of infected erythrocytes (IE) to the host microvascular endothelium is involved. Nevertheless, several bodies of evidence indicate that a unbalance in host immune response and homeostasis, leading to the expression at higher levels of proinflammatory cytokines. Infection of C57BL/6 mice with IE of *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) is the largely used model for CM, as a significant augmentation in the expression levels of proinflammatory cytokines and lactate, neuronal damage and cerebral hemorrhage also occurs.

Hyperbaric oxygen therapy (HBO) has been widely used against anaerobic microorganism and as an adjunct therapy in surgeries. However, in the last year several studies have shown that HBO is able to prevent brain-blood-barrier (BBB) breakdown, inhibit neural damage and the syntheses of proinflammatory cytokines and the expression of ICAM-1, a the host receptors involved in the adhesion of leukocytes and IE.

Herein, we evaluated the HBO effects in preventing CM specific clinical signs in PbA-infected mice and directly against IE of PbA. The data provided by us demonstrated that HBO treatment reduces significantly CM associated mortality and clinical outcomes, such as hypothermia, BBB dysfunction and is able to inhibit parasite burden early on the infection. *In vitro* analysis showed that directly exposure to HBO, up to six hours, is not harmful to health erythrocytes neither inhibit parasite development and infectivity. Finally, HBO treatment was able to delay significantly the CM neurological signs and death, even though administrated after parasite establishment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 ASPECTOS GERAIS	1
1.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS	4
1.3 A PROBLEMÁTICA	7
1.4 CITOADERÊNCIA E MALARIA CEREBRAL HUMANA	10
1.5 MALÁRIA CEREBRAL E SEU MODELO EXPERIMENTAL	16
1.6 OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA (HBO)	18
2. OBJETIVOS	22
3. JUSTIFICATIVA	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
9. LISTA DE ABREVIATURAS	68
10. ANEXO I	69

1. INTRODUÇÃO

Aspectos Gerais

Malaria é a doença parasitária mais importante do mundo. Acredita-se que 2,4 bilhões de pessoas (40%) no mundo estejam em áreas de exposição à infecção, especialmente pessoas que vivem em países tropicais e subtropicais (Figura 1). Nessas regiões cerca de 300 a 500 milhões de casos são diagnosticados todos os anos, causando aproximadamente 1,5 a 2,7 milhões de mortes. (www.who.int). Estima-se que 80% das mortes por malária ocorra na África Sub-Saariana, acometendo principalmente crianças e mulheres grávidas (Hay et al, 2004). Além das mortes, algumas crianças sobreviventes dos casos de malária severa, podem ficar com seqüelas neurológicas irreversíveis, tais como paralisia parcial ou total, perda de funções cognitivas como memória, atenção e dificuldades para falar, podendo permanecer em estado vegetativo (Holding et al, 1999).

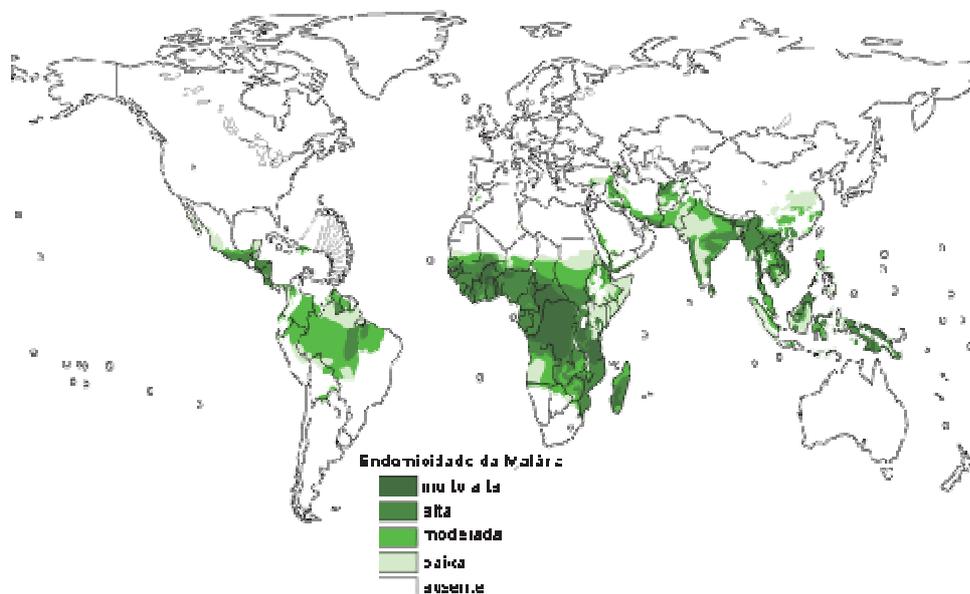


Figura 1: Mapa da distribuição global do risco de transmissão da malária.

(Adaptado de: <http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>)

Recentemente foi constatado que 36% dos casos reportados nas Américas se referem ao Brasil. No ano de 2004, ocorreram aproximadamente 460.000 casos, sendo que 99% ocorre na região da Amazônia legal, principalmente nos estados do Amazonas, Rondônia e do Pará, que registram os maiores índices da doença (Figura 2) (http://portalweb05.saúde.gov.br/portal/arquivos/pdf/be.malaria01_2005.pdf).

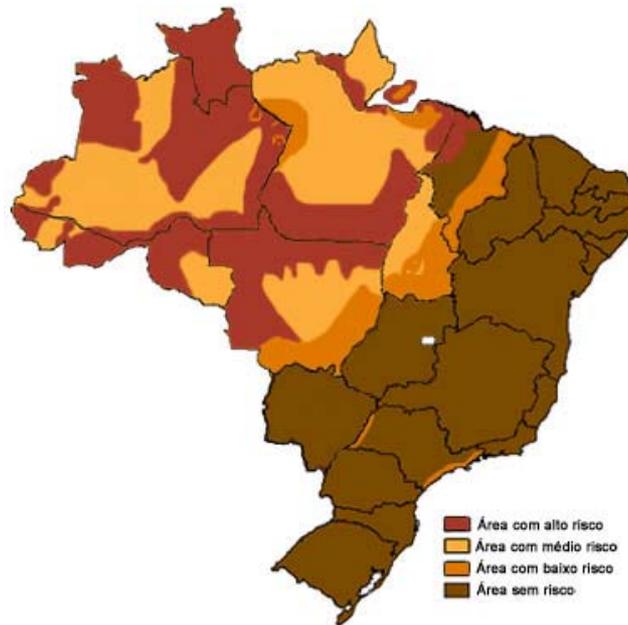


Figura. 2: Áreas de risco de infecções maláricas no Brasil. (Fonte: www.sucen.sp.gov)

Existem quatro espécies de *Plasmodium* que são capazes de infectar o homem, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Entretanto, o *P. falciparum* é o mais importante no tocante à taxa de mortalidade, uma vez que sua infecção está associada às formas severas de infecções maláricas, tais como; malária cerebral (MC) e malária gestacional (MG), decorrentes da citoadesão de eritrócitos infectados (EI) nas microvasculaturas cerebrais ou no trofoblasto placentário, respectivamente (Costa *et al.*, 2006)

A maior parte dos casos de malária no Brasil é devido ao *P. vivax* (80%). No entanto, nos últimos anos, tem-se notado o crescimento do percentual de casos de malária por *P. falciparum*, principalmente nos estados do Amazonas, Maranhão, Pará e Rondônia. Tal incremento é preocupante visto que os casos de malária severa e de óbitos decorrem principalmente deste tipo de *Plasmodium* ([http:// portalweb05.saúde.gov.br/portal/ arquivos/pdf/be.malaria01_2005.pdf](http://portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be.malaria01_2005.pdf)).

Além disso, tem-se observado, que em algumas infecções por *P. vivax* a doença pode evoluir para casos graves semelhantes aos que ocorrem em *P. falciparum*. Neste sentido, um estudo realizado na Tailândia revelou a existência de correlação entre mulheres grávidas, principalmente na primeira gravidez, e o risco de anemia materna e de nascimento de neonatos de baixo peso (Nosten *et al.*, 1999). Foi observada também a deposição de pigmento malárico na placenta de mulheres infectadas por *P. vivax* (McGready *et al.*, 2004). Ambos são considerados aspectos característicos de malária severa em mulheres grávidas infectadas pelo *P. falciparum* (Duffy e Fried, 2005). Recentemente, além das complicações relatadas em mulheres grávidas, estudos de casos de indivíduos com malária *vivax* originários de diferentes países endêmicos fora da África Sub-Saariana foram capazes de diagnosticar trombocitopenia severa, malária cerebral e síndrome respiratória aguda (Makkar *et al.*, 2002; Ozen *et al.*, 2006; Lomar *et al.*, 2005).

Fatores ecológicos como a presença natural do vetor e fatores climáticos, possibilitam a manutenção do ciclo da malária. No entanto, é importante ressaltar, que a propagação da malária é mais que um problema ecológico, é também um problema social, devido à deterioração das condições socioeconômica nas áreas rurais e migração desordenada nas áreas endêmicas (www.who.int).

Além disso, acredita-se que fatores como pré-disposição genética, idade, estado nutricional, número de picadas por mosquitos contaminados e o estado imunológico dos

infectados estejam relacionados ao desenvolvimento das complicações da malária (malária cerebral -MC e malária gestacional - MG) (Newton et al, 1998).

1.2 Aspectos biológicos

Nas quatro espécies de *Plasmodium* que afetam o ser humano, o ciclo de vida é essencialmente o mesmo. Apresenta uma fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado, o mosquito do gênero *Anopheles* e uma fase assexuada (esquizogonia) com a multiplicação no hospedeiro vertebrado. Esta última é composta de um ciclo pré-eritrocítico (assintomático), que ocorre nas células hepáticas, e o ciclo eritrocítico, que se desenvolve nos glóbulos vermelhos e é responsável pelos sintomas, inclusive da malária severa (sintomático).

Em indivíduos não imunes com infecção de *P. falciparum* o período assintomático, desde a picada do mosquito até a invasão dos hepatócitos, é em geral cerca de 14 dias. No entanto, este período depende da carga parasitária injetada e do grau de imunidade e nutricional do indivíduo. Os sinais clínicos da malária ocorrem devido à ruptura dos esquizontes e destruição dos eritrócitos. A maioria dos pacientes apresenta febre, dor de cabeça, calafrios e sudorese. No entanto, outros sintomas como tonturas, dores abdominais, náuseas, diarreia e vômitos também podem estar presentes (Trampuz *et al.*, 2003).

O ciclo do parasita (Figura 3) inicia-se no homem através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, que inocula, juntamente com sua saliva, formas parasitárias denominadas esporozoítos. Estas formas penetram na corrente sanguínea e infectam os hepatócitos, onde começam a se multiplicar por esquizogonia (fase pré-eritrocítica). No entanto, Amino *et al.* (2006), mostraram em trabalho recente que uma parte dos esporozoítos inoculados era drenada pelo sistema linfático para o linfonodo mais próximo, enquanto que outra parte permanecia durante algum tempo na pele

realizando movimentos de “*gliding*” (movimentos contínuos e suaves) ou movimentos espirais, e em seguida penetrava ativamente na corrente sanguínea.

Na fase eritrocítica, os merozoítos livres aderem e penetram no eritrócito, onde começam a degradar a hemoglobina celular. A hemoglobina é digerida pelo parasita gerando aminoácidos para o seu desenvolvimento. Este processo resulta na produção do grupo heme, que é extremamente tóxico ao *Plasmodium*. O acúmulo do grupo heme pode resultar na inibição das proteases do vacúolo digestivo, interferir na geração de radicais livres e eventualmente pode provoca a lise do parasita. Por esse motivo, para evitar a sua intoxicação, o *Plasmodium* transforma o grupo heme em hemozoína, um produto inerte e não tóxico (Carney *et al.*, 2006)

Nos glóbulos vermelhos inicia-se um processo de divisão assexuada, seguido do desenvolvimento do parasita em vários estágios desde anel, trofozoíta, esquizonte jovem até esquizonte maduro, o qual é responsável pela liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, o que dá início a novas invasões dos eritrócitos.

Alguns glóbulos vermelhos infectados diferenciam-se em gametócitos femininos e masculinos, que são encontrados principalmente no sangue periférico. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito ingere os gametócitos, que migram até o intestino, aonde vão se diferenciar em gametócitos femininos e masculinos. A fusão destes gametócitos resulta no zigoto, o qual passa por transformações originando o oocineto. Esta forma penetra na parede das células intestinais, onde se encista na camada epitelial do intestino, passando então a ser chamado de oocisto. O oocisto se divide assexuadamente em inúmeros esporozoítos, até que a célula hospedeira se rompa e os libere no meio extracelular. Estas formas migram até a glândula salivar, fazendo com que os parasitas sejam eliminados durante o repasto sanguíneo dando a continuidade ao ciclo.

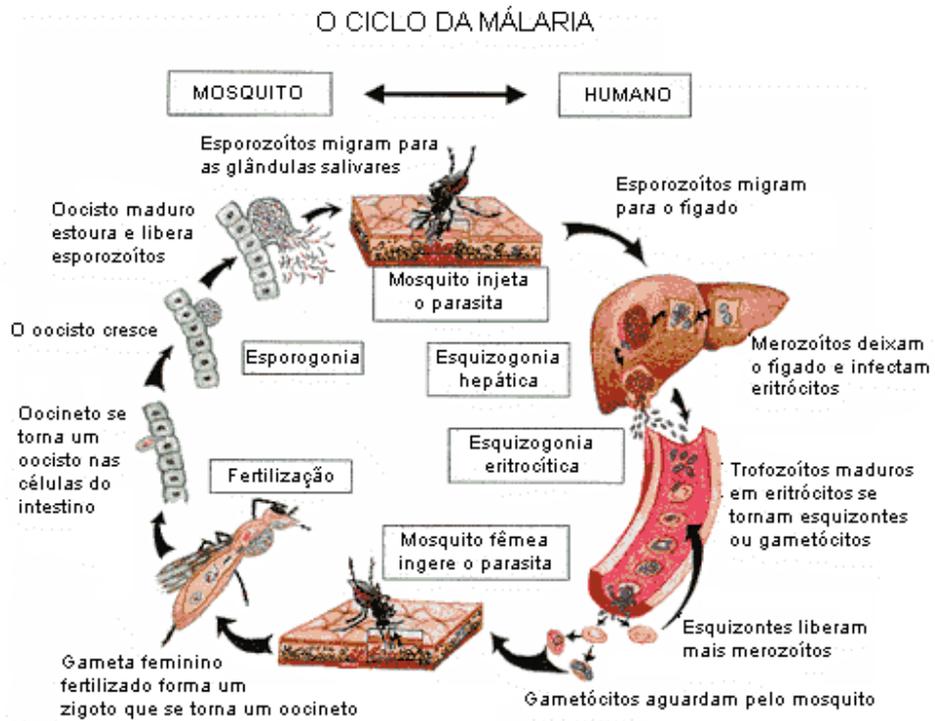


Figura 3: Ciclo da Malária (adaptado de: www.who.int)

1.3 A problemática

Durante anos acreditava-se que o controle do mosquito transmissor da malária seria a solução para a erradicação da doença. A utilização do DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) era tida como a salvação, principalmente para o uso domiciliar, e realmente foi num primeiro momento, pois durante seu uso os níveis de mortalidade e de incidência de malária severa em crianças e grávidas caiu significativamente. No entanto o uso do DDT foi proibido em muitos países, devido aos seus efeitos gravíssimos, provocando o nascimento prematuro e a diminuição da lactação, como também danos ao meio ambiente. O uso indiscriminado do DDT, e de outros piretróides (utilizados posteriormente), provocou o aparecimento de mosquitos resistentes. Deste modo, atualmente, tenta-se encontrar outros inseticidas de ação potente. Tem-se sugerido a mistura de um ou mais inseticidas para tentar evitar o aparecimento da resistência e a erradicação total do vetor (Greenwood *et al.*, 2005).

A alta prevalência da doença, a constante pressão ocasionada pelo uso inadequado das drogas e a rápida reprodução do parasita contribuem para o desenvolvimento da resistência (Daily, 2006), que é uma das principais razões para a morbidade e mortalidade. Além disso, a emergência da resistência, principalmente de *P. falciparum*, tem contribuído para a ressurgência global da malária nas últimas três décadas (Marsh, 1998).

As drogas antimaláricas têm-se mostrado eficientes, no entanto, necessitam de algumas horas para começarem a fazer efeito e atingirem sua eficácia máxima, dessa maneira, em muitos casos de malária severa, essas drogas parecem não ser suficientes, não impedindo os danos irreversíveis e até mesmo a morte (Newton e Krishna, 1998). Além disso, a redução drástica da eficácia de drogas como cloroquina, primaquina e pirimetamina contra infecções maláricas, tem sido reportadas em várias áreas (Le Bras e Durand, 2003; White 2004) devido ao desenvolvimento da resistência.

Acredita-se então, que a vacina contra a malária seja o principal meio de se prevenir os milhões de casos da doença que ocorrem anualmente, no entanto, até agora, nenhuma vacina antimalárica obteve sucesso (Hoffman, 2006). As dificuldades em se encontrar uma vacina antimalárica estão relacionadas com a grande quantidade de estágios e formas que o parasita apresenta durante seu ciclo de vida dentro de seu hospedeiro vertebrado, e conseqüentemente, os diferentes antígenos que são apresentados (Kwiatkowski e Marsh, 1997). O cultivo de espécies de *Plasmodium* como o *P.vivax*, *P.ovale* e *P.malariae*, ainda não é possível, além disto, apesar do *Plasmodium falciparum* poder ser cultivado é difícil gerar grandes quantidades de parasitas fenotipicamente semelhantes, necessárias para o desenvolvimento de produtos ou vacinações em massa. Outro grande problema é o polimorfismo detectado em inúmeros antígenos do parasita (Winter *et al.*, 2004), que dificulta a busca por vacinas, visto que dessa maneira a vacina deve ser elaborada a partir de regiões imunogênicas, que possuem pouco polimorfismo ou que são invariáveis. É nesse sentido que as pesquisas das últimas décadas têm se concentrado, na caracterização de antígenos dos parasitas e nos mecanismos imunológicos efetores, visando assim o desenvolvimento de uma vacina eficaz (Soares e Rodrigues, 1998).

Atualmente vem se tentando desenvolver novas vacinas, sendo que a mais recente (RTS,S/AS02A) é feita a partir de um antígeno recombinante presente em grande quantidade no esporozoítio (circumsporozoítio - CS) de *P. falciparum*, e atua contra o estágio pré-eritrocítico da doença, prevenindo a invasão dos parasitas no hepatócito e seu desenvolvimento nestas células. Essa vacina já vem sendo testada em humanos, apresentando resultados satisfatórios em voluntários expostos experimentalmente à picada de mosquitos infectados com níveis de proteção de até 71%. No entanto, esses níveis de proteção, caíram significativamente quando a vacina foi testada em exposições naturais a infecção, não apresentando resultados satisfatórios, pois promoveu apenas,

proteção parcial nos riscos clínicos (30%) e de episódios de malária severa (58%) em adultos. Além disto, esta proteção é relatada apenas por um curto período de tempo (Alonso *et al.*, 2005).

O tratamento convencional contra infecções maláricas brandas baseia-se no uso de comprimidos de quinino, visto que é a droga mais barata. No entanto, em áreas onde já foram detectados casos de resistência ao quinino, é aconselhável a utilização de cloroquina. Outra droga geralmente utilizada é o artesunato, que é um derivado de artemisina, e é solúvel em água. O artesunato tem eficiência semelhante ao do quinino, porém geralmente tem o custo mais elevado que o do quinino e o da cloroquina (Trampuz *et al.*, 2003; Newton e Krishna, 1998)

O tratamento das formas severas da malária, como a MC, ocorre com as mesmas drogas utilizadas na malária branda, porém geralmente o medicamento tem sua aplicação intravenosa ou intramuscular, já que pacientes com malária severa acabam sendo intolerantes a medicação oral (Trampuz *et al.*, 2003; Idro *et al.*, 2005). Além disso, devido às complicações, algumas terapias adjuvantes são administradas para a melhoria dos sintomas, como drogas antitérmicas, anticonvulsivas, antiinflamatórias, vasodilatadores (reduzem a viscosidade sanguínea e impedem a agregação de plaquetas), além da aplicação de glicose para correção da hipoglicemia, e de transfusão sanguínea em casos de parasitemia acima de 10% (Newton e Krishna, 1998). Deste modo, a organização mundial de saúde, tem sugerido nos últimos anos uma terapia com o uso combinado de vários antimaláricos, como a associação de artesunato-mefloquina e artesunato-SP, a fim de conseguir uma dupla proteção e tentar reduzir o surgimento de cepas resistentes.

1.4 Citoaderência e Malária cerebral humana.

A maioria dos casos de malária apresenta um quadro de febre relativamente simples que é geralmente controlado através de tratamento com drogas antimaláricas. No entanto uma minoria dos casos, cerca de 1%, progride para complicações. Dentre as complicações da malária destacam-se os casos de anemia profunda, acidose metabólica, malária gestacional e os de malária cerebral sendo esta última a responsável pelas mais sérias complicações e pelo maior número de mortes (Mackintosh *et al*, 2004).

A malária severa é um processo multifatorial envolvendo a seqüestração de eritrócitos infectados (EI) por *Plasmodium falciparum* nos endotélios vasculares e a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IFN- β . O fenômeno pode se dar de várias maneiras (Figura 4). Pode ocorrer adesão direta dos EI nos receptores endoteliais, ocorrer à adesão entre os EI, assim como ocorrer adesão entre os EI e os eritrócitos não infectados, formando estruturas denominadas rosetas. Acredita-se que a formação de rosetas facilitaria o sucesso na multiplicação do parasita, que teria uma maior facilidade para invadir eritrócitos sadios (Wahlgren *et al*, 1991). Além disso, recentemente tem-se sugerido que as plaquetas possam agir, através da expressão de CD36, como uma ponte de ligação entre os EI e o endotélio (revisto por Costa *et al.*, 2006). Acredita-se que o processo de adesão aos receptores expressos na superfície das células endoteliais do hospedeiro impede que os EI sejam filtrados e conseqüentemente atacados pelo sistema imune do hospedeiro (David *et al.*, 1983)

A malária cerebral está associada ao *Plasmodium falciparum* e é caracterizada por: convulsões, perda da consciência, ataxia (incapacidade de coordenar os movimentos dos músculos voluntários) paralisia, elevação da pressão cranial decorrente de inchaço cerebral, disfunção da barreira hemato-encefálica e coma (Newton *et al.*, 2000). No entanto, os fenômenos responsáveis pelos aspectos patológicos da malária cerebral ainda são pouco compreendidos.

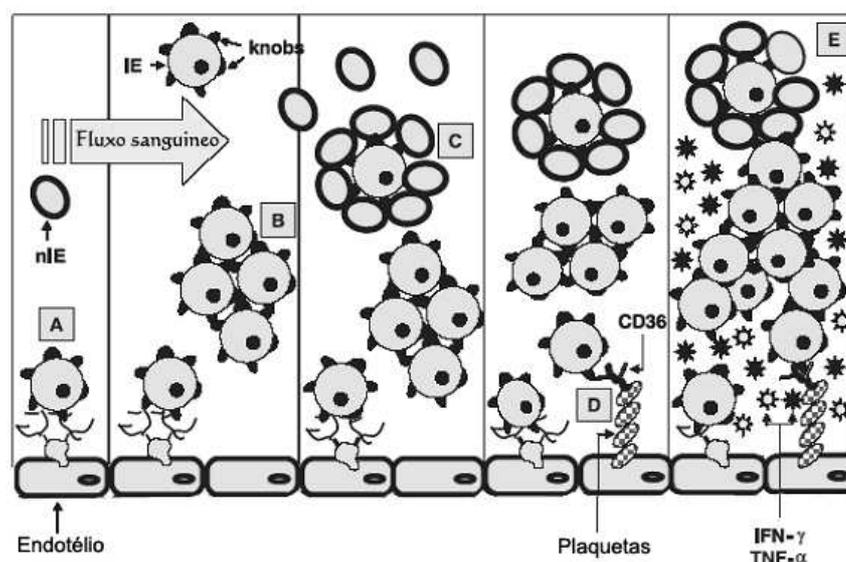


Figura 4 : Mecanismo de sequestração em *Plasmodium falciparum*.

Eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* (A) aderem diretamente ao endotélio através de Knobs. (B) aderem a outros EI (C) aderem a eritrócitos não infectados formando rosetas (D) aderem a plaquetas via CD36. Todos esse fenômenos promovem o bloqueio do fluxo sanguíneo. (E) Produção de citocinas inflamatórias como TNF- e IFN (Adaptado de Costa et al, 2006).

A malária pode resultar também em seqüelas neurológicas irreversíveis em crianças e adultos sobreviventes dos casos de malária severa. Problemas de perda das funções cognitivas, como a fala, são comuns, assim como dificuldades no reconhecimento de pessoas, problemas comportamentais, paralisia parcial dos membros e cegueira. Tais seqüelas são decorrentes da diminuição do fluxo sanguíneo, e conseqüentemente do fluxo de oxigênio, que possivelmente forma um ambiente hipóxico que é extremamente prejudicial às células endoteliais cerebrais, principalmente as células do hipocampo e do lobo temporal, causando déficit de memória e atenção (Grote *et al.*, 1997). Como também podem ser decorrentes de uma grave hipoglicemia, convulsões, anemia severa, aumento da pressão intracranial, aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e do coma (Newton *et al.*, 2000; Newton e Krishna, 1998).

No intuito de entender a patogênese na MC duas hipóteses não excludentes têm sido abordadas. Uma hipótese mecânica decorrente do processo de citoadesão ou seqüestração na microvasculatura de vários órgãos, e uma proposta imunológica (inflamatória), baseada em profundas alterações no balanço de citocinas, decorrente de um elevado aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e a produção de NO levando ao dano tecidual.

a) Hipótese mecânica

Diversas observações apontam o processo de seqüestração parasitária em microcapilares cerebrais como responsável pelos aspectos patológicos na malária cerebral. De fato, análises quantitativas foram capazes de correlacionar a seqüestração de EI e a ocorrência de MC em humanos (MacPherson *et al.*, 1985; Pongponrant *et al.*, 1991; Turner, 1997). Tais estudos demonstraram que pacientes com malária cerebral exibiam um nível de seqüestração no cérebro significativamente maior do que nos demais órgãos, fato que não ocorria com os pacientes que não desenvolveram MC. Além disso, 50% dos pacientes sem MC apresentaram níveis de sequestração menores que os com MC (MacPherson *et al.*, 1985; Pongponratn *et al.*, 1991; Turner, 1997).

Ensaio quantitativo mostrou ainda que ocorre a sequestração de células T no cérebro, especialmente células TCD8+ durante a infecção malárica. Este acúmulo de células T ocorre simultaneamente ao aparecimento dos sintomas neurológicos da malária cerebral, o que sugere fortemente a participação dessas células no desenvolvimento de MC (Belnoue *et al.*, 2002). Acredita-se que a liberação das citocinas nas fases iniciais da infecção pode promover a ativação de TCD8+ e a migração dessas para o cérebro fazendo com que essas células tenham participação na patogênese da MC (Renia *et al.*, 2006).

Estudos *In vitro* identificaram inúmeros receptores expressos na superfície de células endoteliais que são potenciais receptores de EI, tais como ICAM-1, VCAM-1, CD36, E-selectina, P-selectina, HA e CSA (Lou *et al.*, 2001, Mackintosh *et al.*, 2004).

Acredita-se que a adesão de EI também provocaria o bloqueio do fluxo sanguíneo, reduzindo a perfusão nos tecidos e conseqüentemente o suprimento de oxigênio, deste modo um ambiente hipóxico e hipoglicêmico seria gerado, provocando uma maior produção de lactato tanto no sangue como no líquido cérebro espinhal. Além disso, ocorre a diminuição da remoção do ácido láctico, fazendo com que os níveis de lactato se tornem ainda maiores. Este aumento significativo nos níveis de lactato está associado ao aumento da mortalidade (Miler *et al.*, 2002; Hunt e Grau, 2003, Idro *et al.*, 2005). Essas alterações no metabolismo sistêmico (redução do suplemento de oxigênio e glicose) provocam distúrbios na integridade funcional e estrutural das células endoteliais cerebrais, provocando a quebra da barreira hemato-encefálica, e conseqüentemente hemorragia cerebral (Medana e Turner, 2006).

Experimentos de co-incubação de plaquetas, células endoteliais cerebrais deficientes para CD36 e eritrócitos infectados, mostraram que plaquetas, via seus receptores ICAM-1 e CD36, podem servir como uma espécie de ponte para a adesão de EI em células endoteliais cerebrais que usualmente não serviriam como local de citoadesão (Wassmer *et al.*, 2003, Combes *et al.*, 2006).

Apesar da seqüestração de EI parecer ser necessária, este pode não ser o único fenômeno responsável pela malária cerebral, já que o fenômeno de seqüestração não tem sido observado em todos os pacientes que sucumbiram à malária ocasionada pelo *P. falciparum* (van der Heyde *et al.*, 2006). Recentes estudos demonstraram também a presença de leucócitos e plaquetas em amostras cerebrais de crianças que sucumbiram à MC (Grau *et al.*, 2003). no entanto, em outro estudo, cortes histológicos analisados não foi observada a presença de EI aderidos

b) Hipótese imunológica (inflamatória)

A infecção ocasionada pelo *P. falciparum* provoca o aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Sugere-se então que esse desbalanço na expressão de citocinas possa estar relacionado ao processo patológico na malária cerebral. Acredita-se que as citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α e LT desempenhem um papel fundamental na patogenia da MC, possivelmente aumentando a expressão de receptores endoteliais como a ICAM-1, que atuam como receptor tanto de E1 quanto de leucócitos (Grau e De Kossodo, 1994; Beremdt *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989).

Estudos demonstraram um aumento de expressão de TNF- α e IFN- γ no plasma de pacientes com malária severa (Peyron *et al.*, 1994; De Kossodo e Grau, 1993). Mais ainda, baixos níveis de TGF- β e altos níveis de TNF- α foram observados no líquido cérebro-espinhal de crianças com MC implicando uma correlação negativa entre os níveis de TNF- α e TGF- β (Esamai *et al.*, 2003).

Estudo recente realizado na Índia com grupos de pacientes divididos de acordo com o tipo de gravidade da doença (malária cerebral, MC; malária branda, MB; ou malária severa, MS, neste representando outras formas graves da doença exceto MC) foi capaz de associar um determinado “cluster” de citocinas com o tipo da gravidade da malária. Estas análises mostraram que pacientes com MC apresentam elevados níveis de TGF- β , TNF- α , IL-10 e IL-1 β ; enquanto a expressão de IL-12, IL-5 e IL-6 estavam associadas a MB, e IFN- γ e IL-12 com MS (Prakash *et al.*, 2006).

Entretanto, em infecções não letais com *P. vivax* grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias são detectadas, porém não se observa o desenvolvimento de malária cerebral, sugerindo que o desbalanço nas citocinas pode ser necessário, mas não

suficiente para promover o aparecimento de sintomas relacionados à malária cerebral (van der Heyde *et al.*, 2006)

Trabalhos recentes têm mostrado ainda que pacientes com malária cerebral apresentam uma disfunção da homeostase, neste caso, as plaquetas estariam relacionadas a esse equilíbrio. Pacientes com MC exibem sangramentos prolongados e hemorragias cerebrais que confirmam problemas relacionados à coagulação e conseqüentemente na homeostase (van der Heyde *et al.*, 2006). Além disso, o número de plaquetas aderidas no cérebro de crianças que morreram de MC é significativamente maior do que a quantidade encontrada no cérebro de crianças com malária que sucumbiram de anemia profunda ou outras causas, implicando numa possível contribuição das plaquetas na patogênese da malária cerebral (Grau *et al.*, 2003).

As plaquetas também podem agir como células imunológicas efetoras, desse modo acredita-se que elas podem ser uma ponte entre a homeostase e a inflamação, causando danos às células endoteliais, provocando hemorragias e lesões cerebrais (Schofield e Grau, 2005; Lou *et al.*, 2001). Acredita-se que a unificação dessas propostas é o que melhor reflete o complexo processo patogênico da malária cerebral, visto que os processos imunológicos estão intimamente relacionados a homeostase e ao processo de sequestração parasitária.

1.5 Malária cerebral e seu modelo experimental

Apesar de relativo avanço no entendimento de aspectos imunopatológicos da malária cerebral, considerações éticas têm limitado a investigação da patogênese e de terapias contra MC em humanos. Para tentar responder algumas questões sobre a patogênese da MC, modelos murinos têm sido amplamente utilizados principalmente devido à similaridade com o padrão de resposta imune humana.

Embora este modelo experimental de MC não reproduza todas as características da patogênese observadas na malária cerebral humana, diversos estudos foram capazes de mostrar a presença de EI de PbA e leucócitos nos capilares cerebrais (Neill e Hunt, 1992; Jennings *et al.*, 1997; Hearn *et al.*, 2000). Além disto, similaridades entre as vias de resposta imune em camundongos e em humanos, principalmente as mediadas por citocinas pró-inflamatórias, justificam o uso do modelo de malária cerebral murino (Hunt e Grau, 2003). Semelhanças comportamentais e imunológicas também podem ser notadas, assim como disfunção da barreira hemato-encefálica, destruição neuronal, hemorragia cerebral e aumento das concentrações de lactato são características comuns entre a malária cerebral em humanos e no modelo experimental (Hunt & Grau, 2003).

Existem quatro espécies e 13 subespécies de *Plasmodium* de roedores. No entanto, apenas *P. yoelli* e o *P. berghei* têm sido utilizados freqüentemente nos estudos de malária cerebral. A infecção com *P. berghei* ANKA (PbA) em linhagens susceptíveis de camundongos é sem dúvida o modelo experimental que apresenta maior similaridade com os aspectos imunológicos (clínicos), histopatológicos e mecânicos da MC humana (Hunt e Grau, 2003) e por esse motivo é o modelo experimental de infecção malárica mais utilizado.

Na malária cerebral experimental (MCE) a infecção de camundongos C57BL/6 com formas sangüíneas de PbA acarreta uma síndrome neurológica, caracterizada por paralisia total ou parcial dos membros, desvio da cabeça, convulsões e coma, ocorrendo

entre os dias 5 e 10 após a infecção e causando a morte de 60 a 100% dos animais inoculados. Os animais que não apresentam sintomas de malária cerebral até o dia 10-12 pós-infecção sucumbem posteriormente de hiperparasitemia associada a uma profunda anemia (revisito por Engwerda *et al.*, 2005).

Além disso, tanto na malária cerebral humana quanto no modelo experimental, ocorre um aumento na expressão de ICAM-1, molécula de adesão celular que funciona como receptor de leucócitos e que também tem sido descrita como receptor de EI de *Plasmodium falciparum* no cérebro de pacientes infectados (Chakravorty e Craig, 2005).

Estudo recente mostrou a participação de células T CD8 $\alpha\beta$ no cérebro de camundongos com MC e que possivelmente estariam envolvidas na destruição da barreira hematoencefálica (Belnoue *et al.*, 2002). Também em modelo experimental foi recentemente demonstrada a elevada taxa de apoptose neuronal após análises de TUNEL em camundongos infectados com PbA (Wiese *et al.*, 2006).

Experimentos com camundongos apontam para um aumento do volume cerebral durante o desenvolvimento da MC, além disso, danos aos tecidos do corpo caloso, edemas ou lesões na região estrutural da substância branca, lesões no *caudado putamen*, no cerebelo e na hipófise também são notados. Tais estudos mostram ainda uma maior queda do fluxo sanguíneo cerebral, principalmente no *estriatum* e no córtex, (Penet *et al.*, 2005). Edema cerebral difuso é o problema mais comum nos casos de MC. Hemorragias locais ou infartos não hemorrágicos no córtex, tálamo, cerebelo também são descritos em casos de MC, resultando em problemas neurológicos e paralisia (Pantakar *et al.*, 2002) Modelos murinos também têm sido utilizados para entender a mudança da morfologia e distribuição de astrócitos durante o desenvolvimento da malária cerebral, fator que parece estar relacionado diretamente a quebra da barreira sanguínea na retina. Estes estudos também indicam que, além dos monócitos, células como astrócitos e

microglia podem também ser responsáveis pelo aumento da produção de TNF durante a MC (Medana *et al.*, 1997).

1.6 Oxigenação hiperbárica (HBO)

Os primeiros indícios da utilização de oxigênio hiperbárico (HBO) estão relacionados ao tratamento de doenças respiratórias no século XV. No entanto, após um longo período de incredulidade a HBO só volta a ser utilizada a partir da segunda metade do século XX (Garcia-Covarrubias e Sanchez-Rodriguez, 2000).

A terapia com oxigênio hiperbárico (HBO) é definida como um tratamento onde o paciente respira 100% de oxigênio num ambiente pressurizado com pelo menos 1,0 ATA (uma atmosfera absoluta), pressão maior que a pressão ambiental (Garcia-Covarrubias e Sanchez-Rodriguez, 2000). No Brasil o uso da HBO tem seguido as determinações da Sociedade Americana de Medicina Hiperbárica. O uso da terapia hiperbárica com oxigênio é aprovada para tratamentos em humano para inúmeros casos como, queimaduras, gangrena, infecções nos ossos, abscessos intracraniais, anemia, intoxicação por monóxido de carbono, complicações ocasionadas por radiação, infecções de pele, transplante de pele e embolismo (Al-Waili *et al.*, 2005).

A oxigenação hiperbárica ($pO_2 > 760$ mmHg) é também utilizada no tratamento de infecções causadas por bactérias e fungos patogênicos (Gudewicz *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1992). Câmaras hiperbáricas têm sido utilizadas desde a década de 60 como adjuvante em cirurgias e no aumento da atividade de antibióticos (Park *et al.*, 1992). Estudos demonstram que as taxas de sobrevivência e recuperação no pós-operatório são mais elevadas com o uso da HBO (revisito por Clark e Moon, 1999).

A utilização da HBO baseia-se no fato de que tecidos infectados ou lesados apresentam micro-áreas com baixa concentração de oxigênio (hipóxicas), que se expandem devido à perfusão deficiente e ao aumento do consumo de oxigênio por células

e microrganismos infectantes em proliferação. Dessa maneira, a HBO proporciona o aumento da solubilidade do oxigênio no plasma a um nível suficiente para que os tecidos retirem o mínimo de oxigênio carregado pelas hemoglobinas (Kindall, 1999), elevando os níveis sistêmicos e locais do oxigênio necessário para a produção de ATP, para a síntese de proteínas e para a produção de espécies reativas das quais o oxigênio é o substrato.

Além da atividade contra bactérias, fungos e protozoários; estudos *in vivo* têm demonstrado que o tratamento com oxigênio pressurizado tem um efeito na atividade contra protozoários patogênicos (Arrais-Silva *et al.*, 2005; 2006). Estes autores mostraram que tratamento com HBO foi capaz de inibir a proliferação de *Leishmania amazonensis*, pela diminuição da suscetibilidade de macrófagos infectados (Arrais-Silva *et al.*, 2005), e de reduzir o tamanho da lesão de animais infectados e expostos diariamente a HBO diariamente durante 20 dias, assim como os níveis de parasitemia (Arrais-Silva *et al.*, 2006).

A HBO também tem sido utilizada em casos de danos neuronais, mostrando-se capaz de reduzir edemas cerebrais (Niklas *et al.*, 2004), a pressão intracraniana (Rogatsky *et al.*, 2005), danos por necroses, além das conseqüências da isquemia cerebral (Veltkamp *et al.*, 2005a). Neste último caso, a terapia hiperbárica reduziu as lesões na barreira hemato-encefálica (Veltkamp *et al.*, 2005b).

Estudos demonstram ainda que o tratamento com HBO pode produzir uma mudança fisiológica tardia que interrompe a cascata da morte celular, retardando a apoptose (Helms *et al.*, 2005). Estudos *In vivo* e *In vitro* demonstraram que a hipóxia e os danos isquêmicos da barreira endotelial consistem em interações mediadas pela integrina e as células da matriz extracelular, sendo que as alterações das junções endoteliais e a expressão da integrina ocorrem na primeira hora após a isquemia. Num segundo momento ocorre a dissolução da lâmina basal e alterações da função da barreira

microvascular, que contribui para o aumento do número de células inflamatórias e seus mediadores, assim como edema e hemorragia (Veltkamp *et al.*, 2005a)

Inúmeras análises sugerem que o efeito protetor da HBO contra a isquemia cerebral pode estar relacionado com a melhor eficiência no fornecimento de oxigênio e a diminuição do processo inflamatório, através da inibição da ativação dos leucócitos, conseqüentemente na redução do edema e da hemorragia. A terapia com HBO pode ainda trazer melhoras aos danos cerebrais, reduzindo as chances de isquemia e hipóxia (revisto por Al-Waili *et al.*, 2005), além de retardar os danos à barreira hemato-encefálica (BHE) (revisto por Zhang *et al.*, 2005; Veltkamp *et al.*, 2005a).

Sukoff e Ragatz (1982) demonstram também que a terapia com oxigênio hiperbárico pode proporcionar a diminuição da pressão intracranial, através da diminuição do fluxo sanguíneo, entretanto proporcionando o aumento da oxigenação. Outros estudos apontam para o aumento do metabolismo cerebral e a diminuição dos níveis de lactato no líquido cérebro espinhal após tratamento com HBO, indicando que esta terapia pode aumentar o metabolismo aeróbico em pacientes com danos cerebrais (Rockswold *et al.*, 2001).

No modelo de isquemia intestinal em ratos a HBO é capaz de reduzir a seqüestração de neutrófilos e leucócitos, além de diminuir a expressão de TNF- α reduzindo assim os danos causados no pulmão (Yang *et al.*, 2001). Estudos demonstraram ainda que HBO reduz a expressão de TNF- α e IL-10, por monócitos e macrófagos coletados no sangue de ratos quando cultivados na presença de LPS ou em monócitos e macrófagos coletados de sangue humano (Lahat *et al.*, 1995, Benson *et al.*, 2003). Ainda nesta linha de evidências, Yamashita e Yamashita (2000) mostraram que, após forte hemorragia, ratos expostos à HBO tiveram inibição dos níveis de TNF- α e IL-6 circulantes. Além da redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tem sido observado que HBO também é capaz de inibir a produção de RNAm e a síntese protéica

da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), uma enzima associada ao processo inflamatório e a produção de radicais livres (Yin *et al.*, 2002).

Células endoteliais expostas à HBO apresentam aumento significativo na expressão de eNOS (enzima óxido nítrico sintase endotelial), que pode estar relacionado à significativa diminuição do receptor de leucócitos e ICAM-1. O mesmo pode ser observado em estudos com animais tratados com HBO antes e depois da isquemia, que além da diminuição da ICAM-1 também apresentaram uma diminuição na atividade da mieloperoxidase, um marcador de sequestração de neutrófilo (Buras *et al.*, 2000; Milkovilic *et al.*, 2003) e um aumento na expressão de VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular (Lee *et al.*, 2006; Sheikh *et al.*, 2000), fator angiogênico relacionado ao reparo tecidual.

Estudos utilizando tratamento hiperbárico em ratos com hemorragia cerebral, mostraram um efeito protetor no fluxo sanguíneo cerebral dos animais expostos à HBO, e conseqüentemente um efeito protetor contra danos neurológicos. Tais mudanças estão associadas à inibição da expressão de HIF-1 α (Fator de indução de hipóxia-1 α), fator de transcrição nuclear somente expresso em baixas tensões de oxigênio (2%) e a diminuição da expressão do fator pró-apoptótico BNIP-3 (Li *et al.*, 2005; Ostrowski, 2005).

Por fim, a utilização da HBO no tratamento de animais infectados com *Plasmodium berghei berghei* (linhagem incapaz de provocar MC) é relatada em estudo anterior. Neste trabalho é notada uma redução da parasitemia dos animais infectados, nos dias subseqüentes a exposição ao oxigênio hiperbárico (Rencricca *et al.*, 1981). Entretanto, os efeitos da HBO não foram avaliados durante todo o desenvolvimento da parasitemia, além disso, os demais sintomas clínicos e o mecanismo de ação do oxigênio hiperbárico não foram investigados.

2. OBJETIVOS

A presente dissertação analisa os efeitos da HBO na prevenção da MC em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Para isso buscamos:

- A. Determinar a capacidade protetora da HBO contra a malária cerebral em modelo experimental de *P. berghei* ANKA
- B. Avaliar alterações de marcadores de sintomatologia, nos animais infectados e expostos à HBO, em relação aos animais não expostos, sendo eles:
 - a) Parasitemia
 - b) Quantidade de eritrócitos totais
 - c) Temperatura corporal
 - d) Peso (massa corporal)
- C. Verificar através de testes *In vitro* se o efeito da oxigenação hiperbárica ocorre diretamente no parasita ou se este está relacionado à modulação do sistema imune.
- D. Avaliar e quantificar a integridade de barreira hemato-encefálica
- E. Determinar a importância da pressão em combinação com 100% de oxigênio para a indução de neuroproteção em animais infectados com PbA.

3. JUSTIFICATIVA

A administração das drogas existentes atualmente não tem sido suficiente no tratamento das pessoas infectadas com malária, visto que, o progresso dos sintomas é rápido e o efeito do medicamento não é instantâneo. Desta maneira muitos pacientes acabam sucumbindo após 24 horas do início da administração das drogas ou, muitas vezes, permanecem com seqüelas irreversíveis. O desenvolvimento das vacinas é promissor, mas até agora, nenhuma apresentou resultados satisfatórios.

Tendo em vista todos esses fatos, a proposta de se avaliar as possíveis alterações sintomáticas e clínicas dos animais infectados com *Plasmodium* e expostos a condições de HBO pode abrir perspectivas para que esta metodologia possa ser utilizada como terapia adjuvante no combate à malária, em sinergismo com drogas ou vacinas experimentais.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1- Camundongos e Parasitas

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 de 7 a 10 semanas de vida provenientes da Universidade de São Paulo e do CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em condições *Germ-Free* e todos os procedimentos foram analisados de acordo com o comitê de ética em experimentação animal desta instituição (CEEA/UNICAMP) (protocolo n° 857-1).

Duas linhagens de *Plasmodium* foram testadas: *P. chabaudi chabaudi* AS (Pch) e *P. berghei* ANKA (PbA), respectivamente doados pelos professores. Dr. Hernando Del Portillo (Departamento de Parasitologia, ICB, USP, São Paulo, SP, Brasil) e pelo Prof. Dr. Laurent Rénia (Institut Cochin, Paris, França). As formas sanguíneas dos dois parasitas foram coletadas de animais doadores (C57BL/6) previamente infectados com 100 µL de pellet de hemácias infectadas mantidas em criotubo a -80°C; de acordo com o protocolo descrito por Engwerda *et al.* (2005). Os animais foram infectados intraperitoneal (i.p.) com 10⁶ eritrócitos infectados (EI). Os sinais neurológicos de malária cerebral (CM) foram monitorados diariamente, sendo que a incidência de CM foi calculada através da porcentagem de camundongos que desenvolveram esses sinais.

4.2- Análise da parasitemia, da massa corporal relativa, da quantidade relativa de eritrócitos totais e da temperatura.

Com o intuito de se avaliarem possíveis alterações nos sintomas clínicos dos animais infectados expostos, ou não, as condições de HBO analisamos a temperatura, o peso e a variação na quantidade de eritrócitos totais ao longo da infecção dos diferentes grupos de animais.

a) Parasitemia

A parasitemia foi determinada diariamente por meio de esfregaços de sangue obtido da cauda do animal a partir do 4º dia pós-infecção até a morte do animal ou até fase crônica da doença. Os esfregaços foram fixados em metanol e corados com Giemsa (Merck). A porcentagem de parasitemia foi determinada calculando-se o número de EI em 1.000 eritrócitos.

b) Variação relativa da massa corporal da densidade de eritrócitos

As porcentagens de variação da massa corpórea e da densidade de eritrócitos, relativos ao dia 0 de cada animal, foram calculadas, respectivamente, utilizando-se as seguintes fórmulas: [(Peso do animal em gramas num determinado dia pós-infecção / Peso em gramas do mesmo animal no dia 0) x 100] e [(Número de hemácias x 10⁹ por mL de animal num determinado dia pós-infecção / Número de hemácias x 10⁹ por mL do mesmo animal no dia 0) x 100].

c) Temperatura

A temperatura corporal foi determinada diariamente por meio de introdução retal de termômetro digital de precisão (modelo TE-300, Instrutherm).

4.3- Tratamento em condições hiperbáricas

a) *Plasmodium berghei* ANKA (3 ATA)

Camundongos C57BL/6 foram divididos em dois grupos de 8-10 animais. Um grupo controle, não exposto a HBO, e um grupo exposto a 100% de oxigênio medicinal (White Martins), a pressão de 3,0 atmosferas absolutas (ATA), em câmara hiperbárica animal (*Research Chamber, model HB 1300B*, Sechrist Inc. Anaheim, CA, USA), sendo que a exposição à HBO foi realizada em seções diárias de 1 hora, entre os dias 0 e 10

pós-infecção ou em seções diárias de 2 horas a partir do dia 4 até o dia 7 pós-infecção. A câmara foi pressurizada e despressurizada pela razão de 0.5 ATA / min .

O grupo de animais tratado a partir do dia zero foi submetido à câmara hiperbárica por 1 hora a 3 ATA com 100% de oxigênio, após este período, estes animais foram infectados e submetidos novamente a tratamento hiperbárico por mais 2 horas, seguindo o protocolo de Arrais-Silva *et al.* (2005). No dia zero da infecção foram feitas análises da temperatura, do hematócrito e do peso de todos animais do experimento

b) *Plasmodium berghei* ANKA (1.0 ATA)

Para determinar a importância da pressão no tratamento da malária, camundongos C57BL/6 foram divididos em dois grupos de 10 animais. Um grupo controle, não exposto à HBO, e um grupo exposto diariamente à seções de 1 hora (100% O₂ 1,0 ATA,). O grupo de animais expostos à HBO foi submetido à câmara hiperbárica por 1 hora a 1 ATA com 100% de oxigênio, após este período, estes animais foram infectados e submetidos novamente à tratamento hiperbárico por mais 2 hora, seguindo o protocolo de Arrais-Silva *et al.* (2005).

c) *P. chabaudi chabaudi* AS (3.0 ATA)

O mesmo procedimento descrito para *P. berghei* ANKA foi utilizado com *P. chabaudi chabaudi* AS (espécie de *Plasmodium* murino incapaz de induzir MC). Camundongos C57BL/6 foram divididos em dois grupos de 8 animais. Um grupo controle, não exposto à HBO, e um grupo exposto à uma hora diária de HBO (100% O₂, 3,0 ATA, em câmara hiperbárica animal) a partir do dia zero.

4.4- Avaliação e quantificação da integridade de barreira hemato-encefálica

A integridade da barreira hemato-encefálica (BHE) foi avaliada no dia 7 pós-infecção, após a inoculação intravenosa (i.v.) de Azul de Evans (1% em salina) no plexo retro-orbital dos animais, como descrito por Piguet *et al.* (2001), submetidos ou não à HBO. Após 1 hora da inoculação do Azul de Evans os cérebros foram extraídos e fotografados com câmera fotográfica digital (Nikon). O índice de integridade da BHE foi determinado comparando-se a intensidade luminosa (IL) do cérebro dos animais expostos a (HBO) e dos não expostos com a IL medida no cérebro de animais naive. A intensidade luminosa foi medida com auxílio do programa *Adobe Photoshop™*.

4.5- Efeito direto da HBO

Hemácias provenientes de animais sadios e de animais infectados com *P. berghei* ANKA (parasitemia 12%) foram dispostas em placas de 24 poços contendo RPMI 1640 (Sigma), suplementado com soro fetal bovino 10% (Hyclone). Essas placas foram introduzidas em câmara hiperbárica (*Research Chamber, model HB 1300B*, Sechrist Inc. Anaheim, CA, USA) utilizando 100% de oxigênio medicinal (White Martins) pressurizado a 3,0 atmosferas absolutas (ATA) em sessões de 4 ou 6 horas. Simultaneamente, placas contendo o mesmo meio e EI foram deixadas em ambiente externo à câmara pelo mesmo período de tempo e sob a mesma temperatura (21°C).

Para se avaliar o efeito direto do oxigênio hiperbárico a variação do número de eritrócitos totais e a parasitemia das soluções de hemácias, expostas ou não, foram mensuradas antes e após a exposição à HBO. A fim de analisar a infectividade do concentrado de hemácias contendo EI de PbA diretamente exposta ou não a HBO, grupos de 8 animais foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 10^6 EI de PbA provenientes da solução de hemácia expostas 6 horas ou não ao oxigênio hiperbárico.

4.6- Análise estatística

Análises estatísticas de significância comparando os níveis de parasitemia, temperatura, quantidade de eritrócitos totais e integridade da barreira hemato-encefálica entre os grupos de animais expostos, ou não, às condições hiperbáricas foram realizadas através do teste Mann-Whitney. As diferenças entre as taxas de letalidade foram analisadas pelo teste de Log-Rank. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa BioEstat versão 3.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

a) Exposição diária a HBO a partir do dia zero (3 ATA)

A fim de verificar a capacidade neuroprotetora da terapia com oxigênio hiperbárico, dois grupos de 10 camundongos foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, um grupo controle e outro exposto diariamente as condições da HBO (100% O₂, 3 ATA), durante 1 hora por dia.

Como é mostrado na Figura 5, 100% dos camundongos do grupo controle exibiram sinais neurológicos de malária cerebral (ataxia, convulsões, paralisia e coma) entre os dias 5 e 8 pós-infecção, morrendo após 24 horas do início dos sintomas. O pico da mortalidade ocorre dia 7 pós-infecção, dia em que a maioria dos animais (80%) morre. Todos os animais do grupo controle estavam mortos até o dia 9. Surpreendentemente, somente 50% dos animais infectados e expostos a sessões diárias de HBO (1 hora, 3 ATA, 100% O₂) exibiram sinais neurológicos de malária cerebral e sucumbiram à doença. Além disso, nota-se que o grupo exposto à HBO, em contraste com o grupo não tratado, teve um significativo atraso no aparecimento dos sintomas neurológicos e conseqüentemente um atraso na morte.

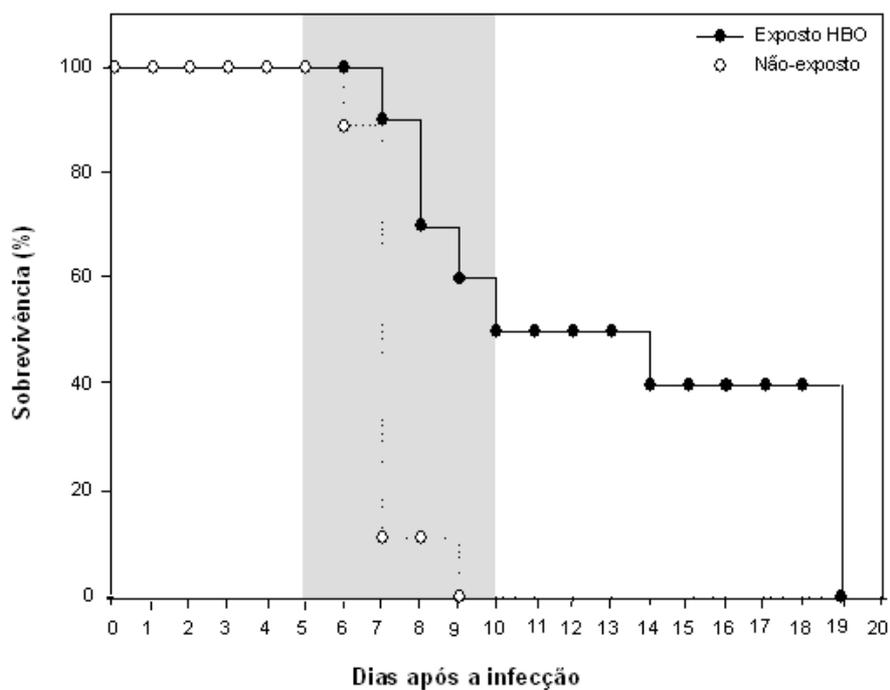
As mortes do grupo exposto HBO iniciam-se no dia 7 e seguem até o dia 10 (40% do total das mortes), ocorrendo apenas mais uma morte dia 14. Os demais animais do grupo tratado que não apresentaram sintomas (50%), morrem dia 19 após a infecção resultado de uma hiperparasitemia (cerca de 60%) associado a uma grave anemia. Tais resultados contrastam com o grupo controle onde 80% das mortes ocorrem dia 7. A comparação das curvas de sobrevivência dos dois grupos de animais (exposto ou não à HBO), demonstra a existência de diferença acentuada e significativa durante toda a infecção, dia 0-12 (LogRank $P= 0,0004$). Desta maneira, estes resultados demonstram claramente o efeito protetor contra MCM por parte do tratamento hiperbárico.

Foi mostrado que a terapia com HBO tem efeito no desenvolvimento de *Leishmania amazonensis* e em linhagens de *Plasmodium berghei* que não provocam MC (Arrais-Silva *et al.*, 2005; Arrais-Silva *et al.*, 2006 e Rencricca *et al.*, 1981), tendo em vista esses fatos nós analisamos possíveis alterações na parasitemia, temperatura, peso e quantidade total de eritrócitos dos animais infectados expostos, ou não, à condições de HBO ao longo da infecção. Desta maneira determinamos os níveis de parasitemia, o peso, temperatura e a quantidade total de eritrócitos, a partir do 4º dia após a infecção.

Conforme pode ser observado na Figura 6 e na Tabela 1 os camundongos infectados com PbA e expostos a HBO tiveram uma diminuição significativa da parasitemia em relação ao controle, principalmente nos dias 4, 5 e 6 pós-infecção. No entanto, em animais infectados com *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS (PchAS), e expostos a HBO (100%, 3 ATA, 1h/dia), ocorre uma redução significativa na parasitemia apenas no dia 3 pós-infecção, nos demais dias que se seguem durante o desenvolvimento do parasita, o resultado mostra-se contrário ao notado em *P. berghei* ANKA, ocorrendo um leve aumento nos níveis de parasitemia nos animais expostos aa HBO em relação aos animais não expostos, principalmente nos dias de maior parasitemia (Figura 7 e Tabela 1).

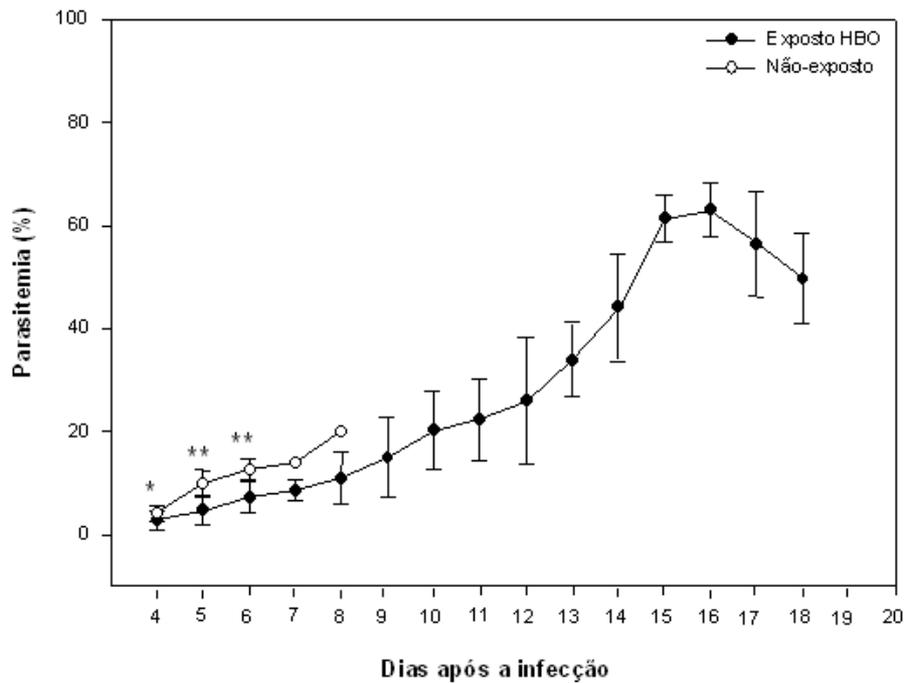
Quando analisamos os demais padrões dos sintomas clínicos nota-se que não houve diferenças significativas quando comparamos a densidade relativa de eritrócitos e o peso dos animais expostos diariamente ou não à terapia hiperbárica (Tabela 2 e 3). No entanto, ao analisarmos a queda de temperatura, sintoma característico durante o desenvolvimento de malária cerebral em murinos, constatamos uma diminuição menos pronunciada da temperatura corporal dos animais não expostos em relação ao grupo HBO (Tabela 4). Esta diferença foi marcante nos dias 6 e 7 pós-infecção, durante o pico dos sintomas neurológicos da malária cerebral.

Figura 5:



HBO protege contra malária cerebral experimental. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 10^6 EI de *P. berghei* ANKA diariamente expostos ($n=10$), ou não ($n=10$) à HBO durante 1 h a partir do dia 0 até o dia 10 (100% O_2 , 3 ATA). Todos os animais do grupo não exposto estavam mortos até o dia 9. Teste de Log-rank $P = 0.0004$, exposto vs. animais não-expostos. () Período de manifestação dos sintomas neurológicos de MC. Resultados representam um de três ensaios independentes.

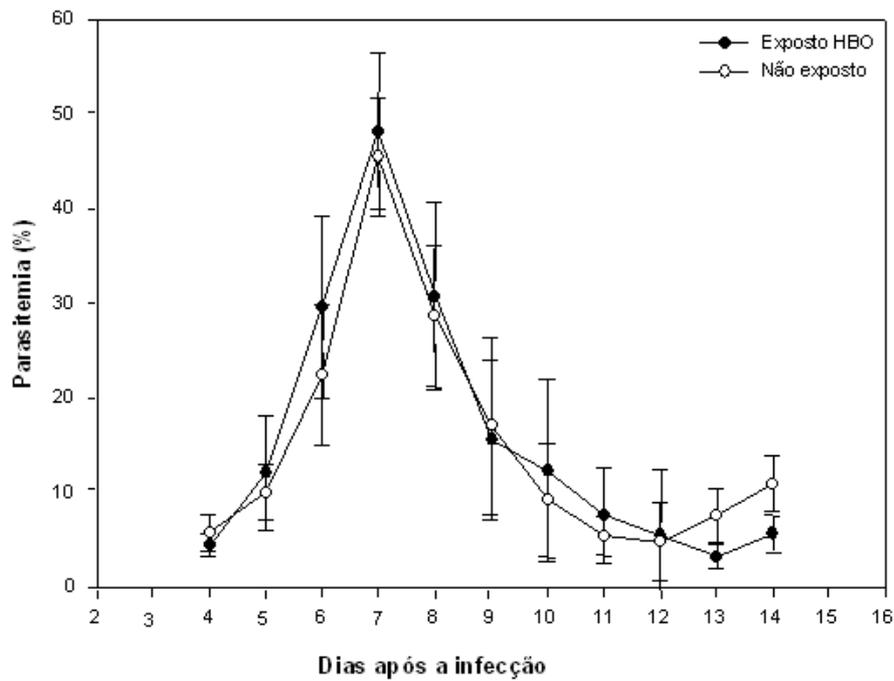
Figura 6:



Tratamento hiperbárico reduz os níveis de parasitemia em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA (PbA).

Nível de parasitemia de camundongos infectados com 10^6 EI de PbA diariamente expostos ($n=10$), ou não ($n=10$) à HBO durante 1 h a partir do dia 0 até o dia 10 (100% O_2 , 3 ATA). Os resultados são expressos como a média de cada grupo de camundongos \pm o desvio padrão. Resultados representam um de três ensaios. (*) e (**) representam respectivamente $P < 0.05$ e $P < 0.005$; exposto vs não-exposto.

Figura 7:



Efeito do oxigênio pressurizado no desenvolvimento parasitário em camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi chabaudi* AS (Pch). Porcentagem de parasitemia de camundongos infectados com 10^6 EI de PchAS diariamente expostos ($n=8$), ou não ($n=8$) à HBO durante 1 h a partir do dia 0 até o dia 10 (100% O_2 , 3 ATA). Os resultados são expressos como a média de cada grupo de camundongos \pm o desvio padrão. Resultados representam um de três ensaios.

Tabela 1. Efeito *In vivo* do oxigênio hiperbárico (HBO) no desenvolvimento dos parasitas. Nível de parasitemia dos camundongos infectados com *P. berghei*/ANKA- (PbA) ou *P. c. chabaudi*/AS (PchAS), exposto ou não, à HBO ^a.

	Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
	Parasitemia (%) / SD ^b	n ^c	Parasitemia (%) / SD	n	Parasitemia (%) / SD	n	Parasitemia (%) / SD	n
PbA								
Exposto (HBO)	2.8 ± 1.99	10	4.7 ± 2.91	10	7.3 ± 3.16	10	8.7 ± 2.06	09
Não-exposto	4.1 ± 1.51	09	9.9 ± 2.62	09	12.7 ± 2.08	08	14.1 ± 0.00	01
Significância ^d	P=0,0102		P=0,0022		P=0,0025		ND ^f	
Pch								
Exposto (HBO)	4,45 ± 1,21	08	12,12 ± 6,06	08	29,65 ± 9,67	08	48,23 ± 8,25	08
Não-exposto	5,76 ± 1,94	08	10,06 ± 2,92	08	22,45 ± 7,48	08	45,52 ± 6,25	08
Significância	NS ^e		NS		NS		NS	

^a Camundongos C57BL/6 foram infectados i.p. com 10⁶ EI de *P. berghei*/ANKA (PbA) ou *P. c. chabaudi* (PchAS) e diariamente exposto, ou não, a HBO por 1 hora a 3 ATA durante 10 dias consecutivos pós-infecção.

^b Média e desvio padrão dos valores de parasitemia de um determinado grupo de camundongos.

^c n = Número de animais por grupo.

^d Análise estatística, pelo teste de Mann-Whitney, entre os camundongos expostos e não-expostos.

^e NS = Não significante.

^f ND = Não determinado.

Tabela 2. Efeito da HBO na densidade (n° total de eritrócitos) de eritrócitos. Porcentagem de hemácias totais, relativo ao dia 0, de camundongos C57BL/6 infectados com 10⁶ EI de *P. berghei*/ANKA expostos, ou não, à condição de oxigenação hiperbárica (HBO) ^a.

	Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
	Densidade (%) ± SD ^b	n ^c	Densidade (%) ± SD relativa	n	Densidade (%) ± SD relativa	n	Densidade (%) ± SD relativa	n
HBO	107,33 ± 18,48	10	104,94 ± 19	10	96,29 ± 21,95	10	73,72 ± 21,69	09
Não-Exposto	114,51 ± 21,89	09	112,74 ± 25,22	09	111,03 ± 26,08	08	72,67 ± 0,00	01
Significância ^d	NS ^e		NS		NS		ND ^f	

^a Animais infectados com 10⁶ EI foram expostos à HBO diariamente por 1H a uma pressão de 3 ATA durante 10 dias consecutivos a partir do dia 0.

^b Média e desvio padrão de um determinado grupo de animais.

^c n = Número de animais por grupo

^d Análise estatística, pelo teste de Mann-Whitney, entre os camundongos expostos e não-expostos ^e

^e NS = Diferença não significativa.

^f ND = Variável não determinada.

Tabela 3. HBO não interfere no peso corpóreo de animais infectados. Porcentagem do peso, relativa ao dia 0, de camundongos C57 BL/6 infectados com 10^6 HI de *P. berghei*/ANKA e expostos, ou não, à condição de oxigenação hiperbárica (HBO) ^a.

	Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
	Peso (%) \pm SD ^b	n ^c	Peso (%) \pm SD	n	Peso (%) \pm SD	n	Peso (%) \pm SD	n
HBO	91,77 \pm 5,46	10	88,98 \pm 4,82	10	86,94 \pm 4,58	10	81,91 \pm 4,59	09
Não-Exposto	90,48 \pm 6,14	09	88,02 \pm 4,50	09	82,65 \pm 3,94	08	66,02 \pm 0,00	01
Significância ^f	NS		NS		NS		ND ^e	

^a Animais infectados com 10^6 EI foram expostos a HBO diariamente por 1H à uma pressão de 3 ATA durante 10 dias consecutivos a partir do dia 0.

^b Média e desvio padrão de um determinado grupo de animais.

^c n= Número de animais por grupo.

^d NS = Diferença não significativa.

^e ND = Variável não determinada.

^f Análise estatística; teste ANOVA (1 critério) em relação ao grupo não exposto. Diferença significativa quando $p < 0,05$

Tabela 4. HBO protege contra hipotermia severa. Temperatura dos animais expostos à HBO ou não exposto, após infecção com *P. berghei*/ANKA^a.

	Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
	Temperatura (°C) / SD ^b	n ^c	Temperatura (°C) / SD	n	Temperatura (°C) / SD	n	Temperatura(°C) / SD	n
Exposto (HBO)	36,8 ± 1,57	10	37,94 ± 0,68	10	38,27 ± 0,39	10	36,15 ± 1,41	09
Não-exposto	38,18 ± 0,46	09	38,53 ± 0,61	09	31,7 ± 4,1	08	32,5 ± 0,00	01
Significância ^d	NS ^e		NS		p=0,0006		ND ^f	

^a Temperatura relativa ao dia zero de camundongos C57BL/6 infectados com 10⁶ EI e expostos diariamente, ou não à HBO, por 1 hora a 3 ATA durante 10 dias consecutivos a partir do dia zero.

^b Média e desvio padrão da porcentagem relativa da queda da temperatura de um determinado grupo de camundongos.

^c n = Número de animais por grupo.

^d Análise estatística, pelo teste de Mann-Whitney, entre os camundongos expostos e não-expostos

^e NS = Não significante

^f ND = Não determinado.

b) Exposição diária à HBO a partir do dia zero (1 ATA)

Para nos certificarmos se somente a exposição de 100% oxigênio seria capaz de induzir neuroproteção, camundongos infectados foram submetidos a 100% de oxigênio a 1 ATA (pressão atmosférica). Neste ensaio não foram encontradas diferenças significativas ($P = 0,445$) na mortalidade entre os grupos exposto e controle (não exposto) (Figura 8). Todos os animais do grupo exposto a 100% de oxigênio exibiram sintomas de MC, no entanto morreram posteriormente aos animais do controle, indicando um pequeno, porém não suficiente, efeito benéfico do oxigênio. Tais resultados mostram claramente que os efeitos neuroprotetores resultam da combinação de oxigênio 100% e pressão

c) Experimento *In vitro*

Os resultados da exposição diária dos animais infectados com PbA à HBO (100% O₂, 3 ATA) mostraram uma redução significativa na parasitemia, por esse motivo achamos necessário realizar um ensaio *In vitro* a fim de verificar se o oxigênio hiperbárico é capaz de agir diretamente sobre o parasita inibindo seu desenvolvimento e infectividade.

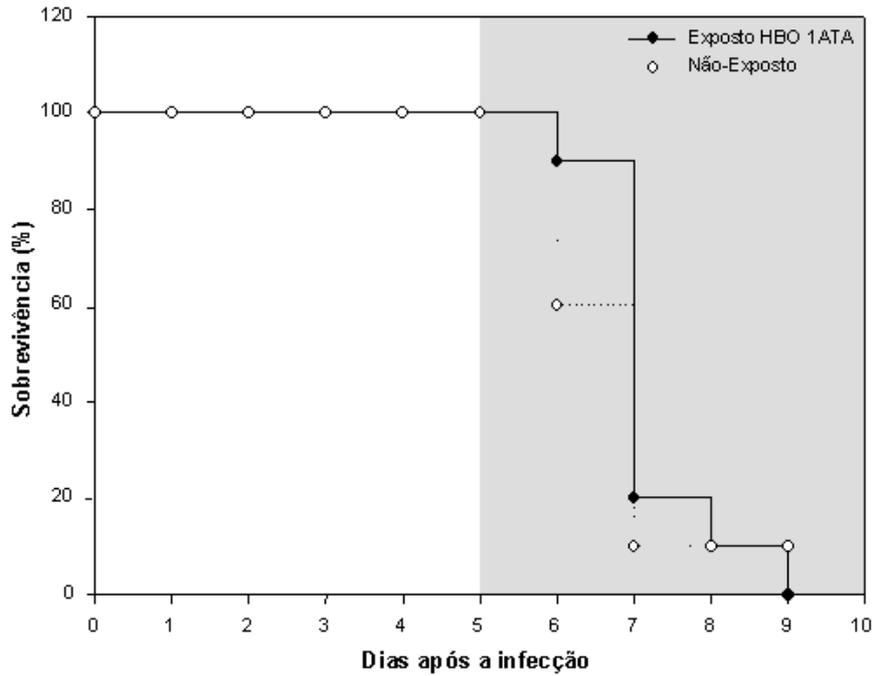
Por tal motivo, sangue de animais previamente infectados com PbA foi coletado e depositado em placas de 24 poços e exposto às condições HBO (100%, 3ATA), durante 4 ou 6 horas, para analisarmos a variação do número de eritrócitos totais e os níveis de parasitemia. Simultaneamente outra placa contendo a mesma mostra de sangue foi deixada ao lado da câmara hiperbárica. A temperatura da sala foi ajustada de acordo com a temperatura interna da câmara (21°C), a fim de evitar outras variáveis.

Conforme é notado na Figura 9, não houve diferenças significativas no número de EI totais expostas diretamente a HBO durante 4 ou 6 horas, em relação às EI totais não expostas. Entretanto, quando analisamos os níveis de parasitemia notamos uma redução significativa no número de hemácias infectadas quando comparado ao nível inicial de parasitemia tanto nas placas expostas quanto nas não expostas. (Figura 10). Porém, o grupo não exposto teve uma redução de parasitemia mais pronunciada ($P < 0.005$) que o e o grupo exposto a HBO ($P < 0,05$) após 6 horas de exposição.

Com o intuito de se determinar se EI viáveis, expostas ou não à HBO, eram capazes de induzir malária cerebral, camundongos suscetíveis foram infectados com 10^6 (EI) da solução de hemácias expostas ou não expostas a HBO após 6 horas. Como mostrado na Figura 11, os camundongos infectados com EI expostos diretamente a HBO ou inoculados com os EI deixados fora da câmara hiperbárica não apresentaram diferenças significativas no aparecimento de sintomas e conseqüentemente na mortalidade. Tais resultados sugerem então que a terapia com HBO não afeta diretamente os eritrócitos infectados com PbA e nem alteram sua habilidade em induzir os sintomas da malária cerebral.

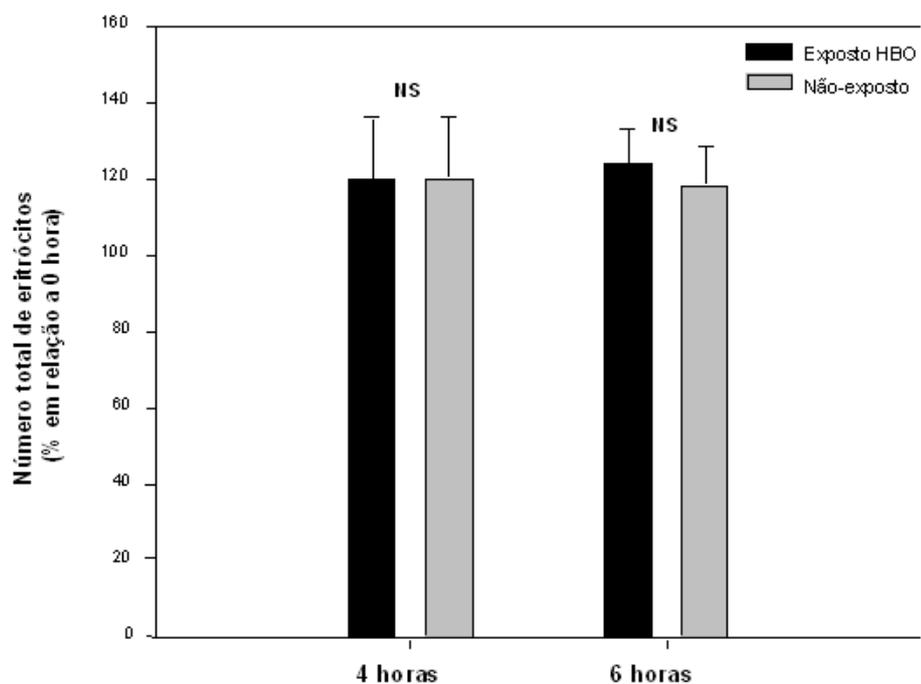
Por fim, foi averiguada a possibilidade da exposição a HBO ter um efeito deletério em hemácias sadias de camundongos. Para isso realizamos ensaios *In vitro*, onde foi determinada a densidade de eritrócitos expostas a HBO (100%, 3 ATA) em diferentes intervalos de tempo. Como mostrado na figura 8, a densidade de eritrócitos se manteve inalterada, demonstrando que a terapia com HBO não é tóxica aos eritrócitos sadios (não infectados) (Figura 12).

Figura 8:



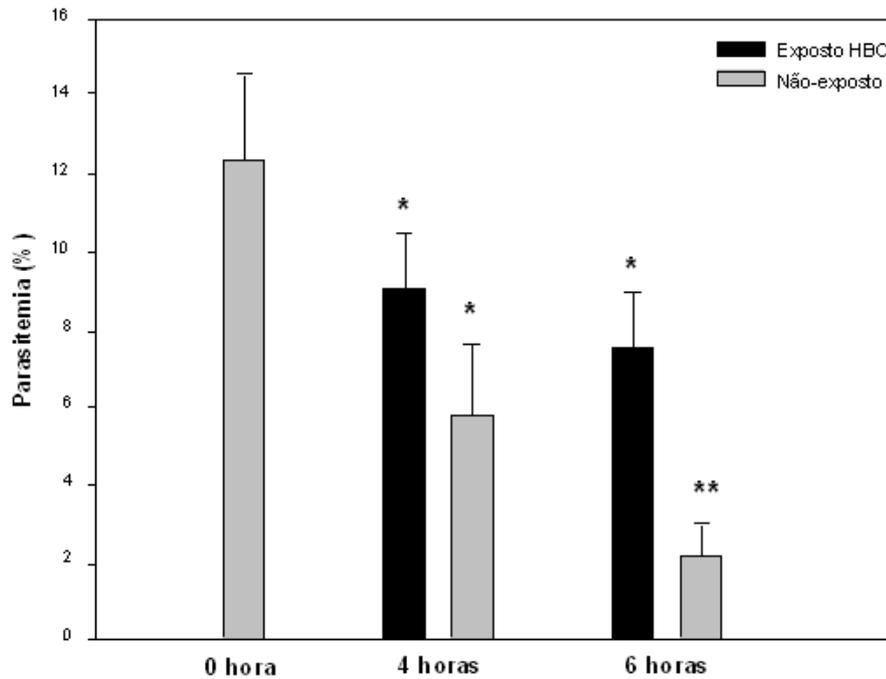
Hiperóxia em condições normobáricas não induz proteção contra MC. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com 10^6 EI de PbA diariamente expostos ($n=10$), ou não ($n=10$) à HBO durante 1 h a partir do dia 0 até o dia 10 (100% O_2 , 1 ATA). Teste de Log-rank $P = 0,4450$ exposto vs animais não-expostos. (■) Período de manifestação dos sintomas neurológicos de MC.

Figura 9:



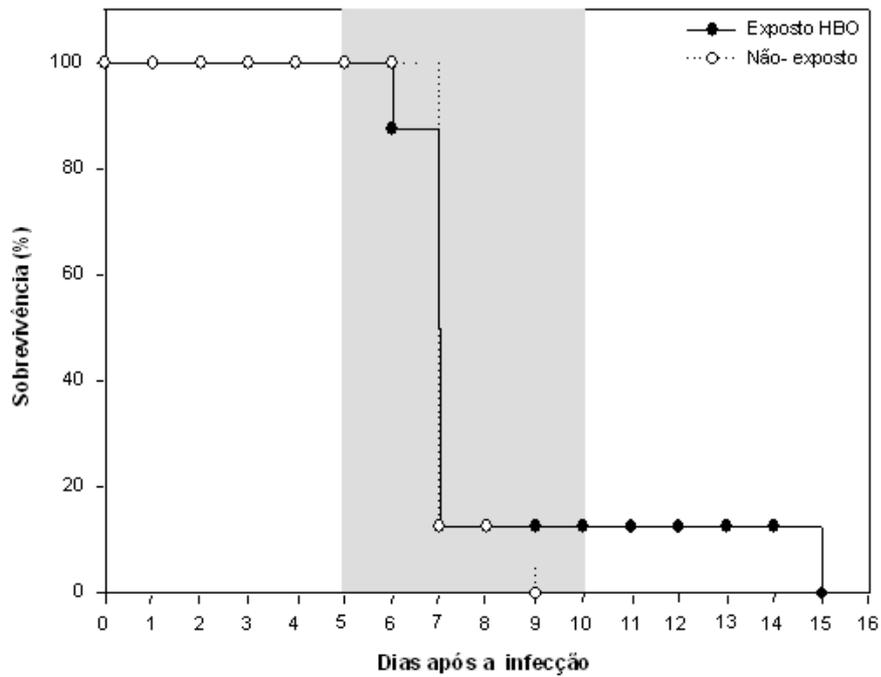
Exposição direta à HBO não altera a densidade de EI de *P. berghei* ANKA. Porcentagem da perda de eritrócitos, relativa ao tempo zero, de 10^6 EI /mL de *P. berghei* ANKA, diretamente expostos, ou não, à HBO (100% O_2 , 3 ATA). Resultados representam a média de quadruplicata \pm desvio padrão. NS representa diferença estatística não significativa.

Figura 10:



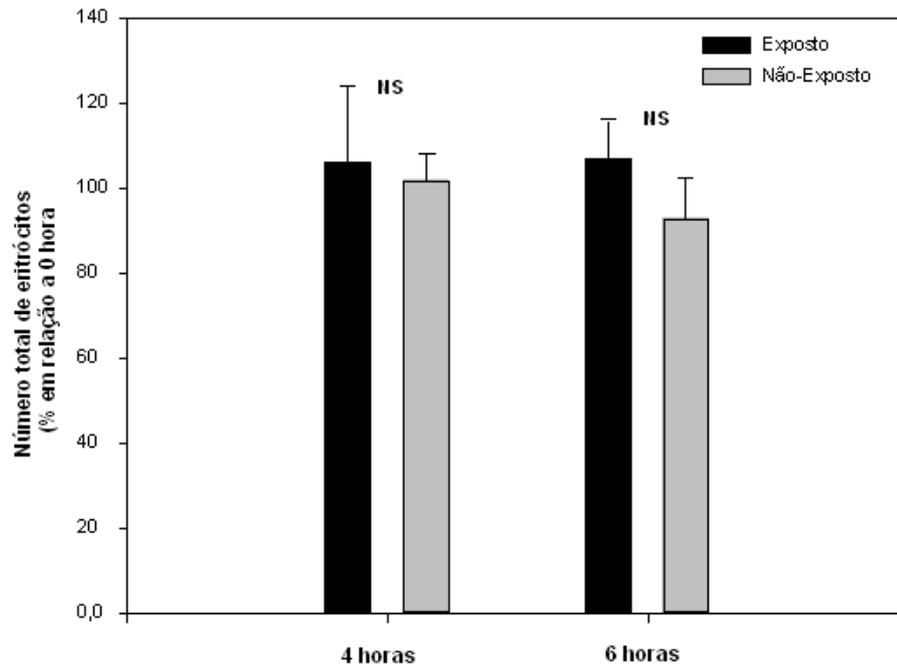
Efeito direto da HBO na viabilidade de EI de *P. berghei* ANKA. 10^6 EI /mL de PbA em uma placa com 24 poços foram diretamente expostos, ou não, à HBO (100% O_2 , 3 ATA). Níveis de parasitemia foram medidos após 4 ou 6 horas de exposição ou não ao oxigênio hiperbárico e comparados ao tempo zero. Resultados representam a média de quadruplicata \pm desvio padrão. (*) e (**) representam respectivamente $P < 0.05$ e $P < 0.005$;

Figura 11:



Efeito direto da HBO na infectividade de EI de *P. berghei* ANKA (PbA). 10^6 EI /mL de PbA em uma placa com 24 poços foram diretamente expostos, ou não, à HBO (100% O_2 , 3 ATA). Curva de sobrevivência de camundongos (n=8 animais por grupo) infectados com 10^6 EI de PbA após 6 horas de exposição direta, ou não a condições de HBO. Teste de Log-rank: $P = 0,9458$; exposto diretamente vs não-exposto EI. (■) Período de manifestação dos sintomas neurológicos de MC

Figura 12:



Efeito direto da HBO em eritrócitos sadios. Porcentagem da perda de eritrócitos sadios, relativa ao tempo zero, diretamente expostos, ou não, a HBO (100% O₂, 3 ATA). Resultados representam a média de quadruplicata ± desvio padrão. NS: representa diferença estatística não significativa. NS representa diferença estatística não significativa.

c) Barreira hemato-encefálica

Visto que a quebra da barreira hemato-encefálica representa um dos sinais de MC, nós avaliamos a atividade do oxigênio hiperbárico na proteção da integridade dessa barreira. Para isso foi inoculada uma solução intravenosa de Azul de Evans (1% em salina) no dia 7 pós infecção (dia do pico de sintomas neurológicos e das mortes) e após 1 hora os cérebros foram coletados e fotografados.

Conforme pode ser observado na Figura 13, os cérebros coletados dos animais não expostos ao oxigênio hiperbárico apresentam-se mais corados que os cérebros coletados de animais expostos diariamente à HBO e dos animais *naive*. Tal diferença é resultante da incorporação do Azul de Evans pelos tecidos cerebrais em consequência da quebra da barreira hemato-encefálica.

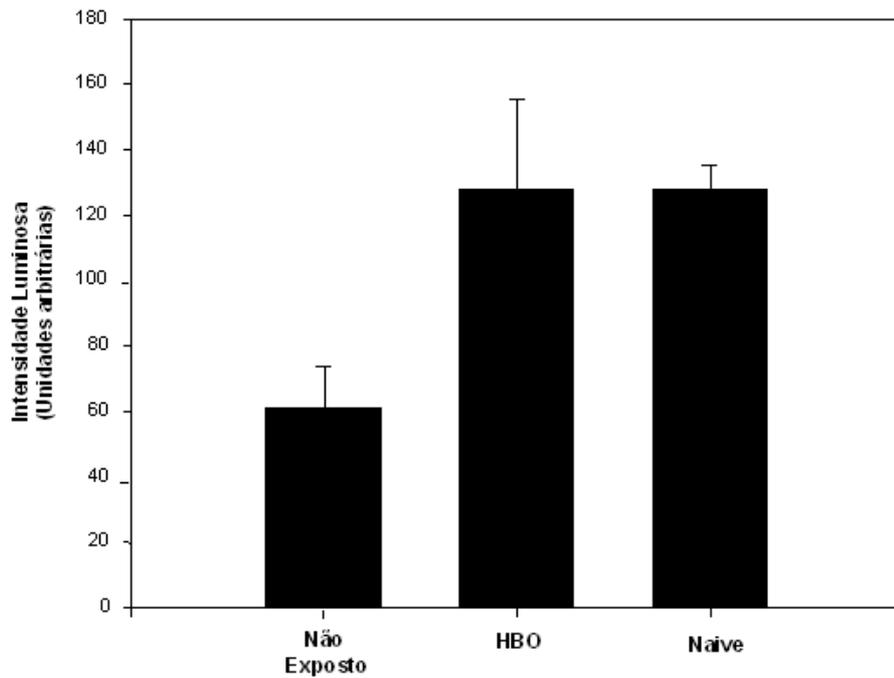
Para determinar o grau da disfunção da barreira hemato-encefálica em animais infectados expostos ou não à HBO, comparamos a intensidade luminosa dos cérebros de animais *naive*, com os cérebros dos animais infectados (controle) e dos animais infectados e expostos à HBO (Figura 14). Os resultados demonstram uma significativa ($P=0,0039$) redução da quebra da BHE nos animais expostos a HBO quando comparados aos animais não-expostos. Tais resultados demonstram que a terapia com oxigênio hiperbárico pode proteger contra a quebra da barreira hemato-encefálica.

Figura 13:



Análise da integridade da Barreira Hemato-Encefálica. Grupo de camundongos C57BL/6 infectados com 10^6 EI of *P. berghei* ANKA expostos, ou não à HBO (100% O_2 , 3 ATA) foram inoculados i.v. com solução de 1% de Azul de Evans diluída em PBS, no dia 7 após infecção. Uma hora após a inoculação com o Azul de Evans, os cérebros dos animais infectados, expostos ou não-expostos à HBO, foram coletados e fotografados. Foram utilizados os 6 animais mais representativos, dentre os quais 4 são mostrados.

Figura 14:



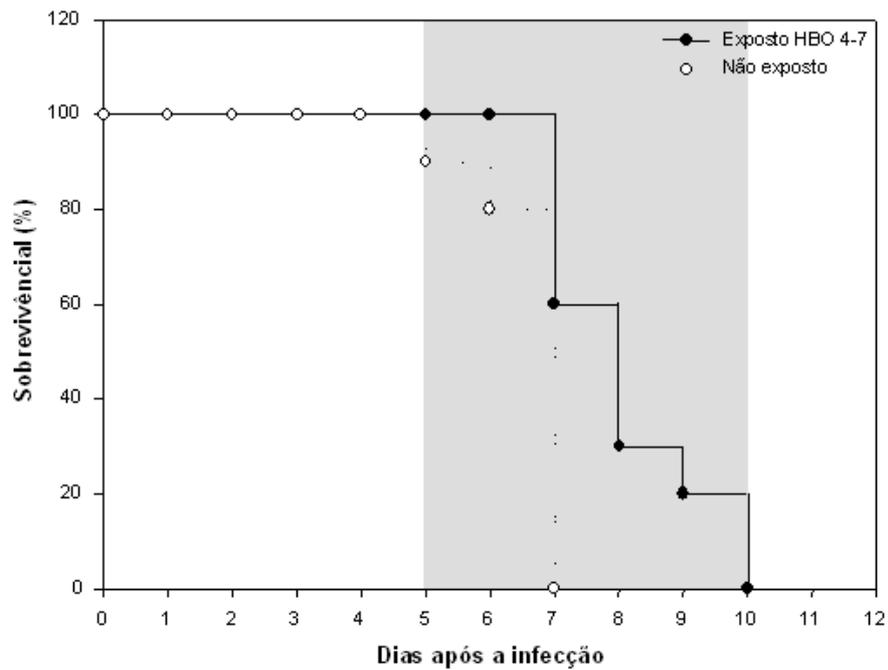
Quantificação da integridade da Barreira Hemato-Encefálica. Grupo de camundongos C57BL/6 infectados com 10^6 EI of *P. berghei* ANKA expostos, ou não à HBO (100% O_2 , 3 ATA) foram inoculados i.v. com solução de 1% de Azul de Evans diluída em PBS, no dia 7 após infecção. Intensidade luminosa determinada com o auxílio do programa Adobe Photoshop™. $P = 0.0039$; ANOVA; *naive* vs não-exposto, NS representa diferença estatística não significativa. Resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

d) Exposição diária a HBO à partir do dia 4

Por fim, analisamos a capacidade do oxigênio hiperbárico de induzir proteção quando a parasitemia já estava patente, desta maneira os camundongos infectados foram expostos a duas horas diárias de HBO (100% O₂ / 3 ATA/ dia), entre os dias 4 - 7 após infecção. Os resultados apontam para um retardo significativo (P= 0,003) no aparecimento dos sintomas neurológicos característicos da malária cerebral e conseqüentemente retardam também a morte (Figura 15).

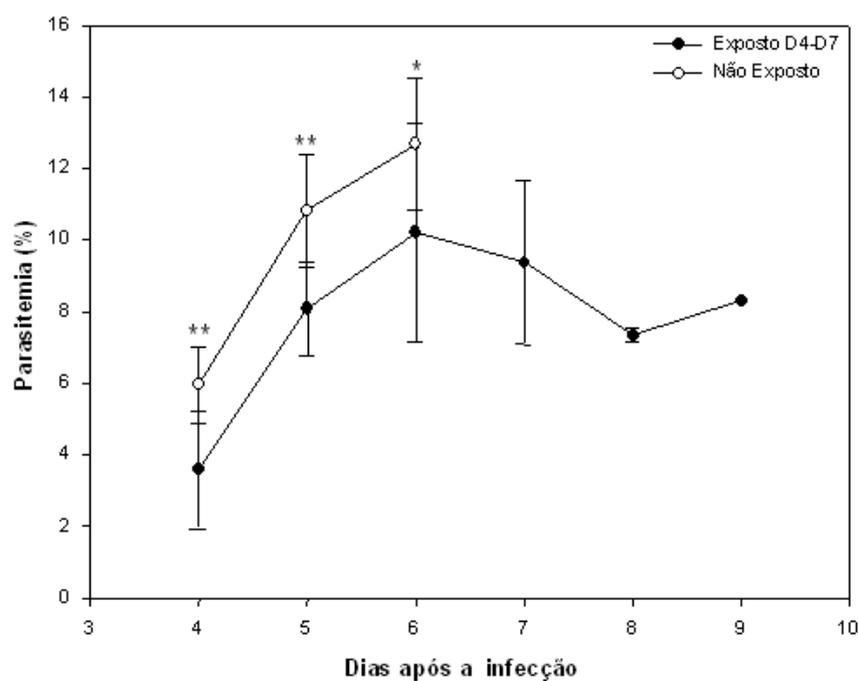
A comparação das curvas de parasitemia dos dois grupos de animais (exposto D4-D7 ou não a HBO) apontam para uma diminuição significativa da parasitemia do grupo exposto D4-D7 à HBO em relação ao grupo controle, nos dias 4, 5 e 6 pós-infecção (Figura 16), fato que corrobora com os resultados obtidos com os animais tratados todos os dias a partir do dia zero. Indicando mais uma vez que o tratamento hiperbárico tem efeito protetor contra MC.

Figura 15:



Tratamento hiperbárico retarda o aparecimento dos sintomas da MCE em camundongos C57BL/6 infectados com PbA quando a parasitemia já é patente. Camundongos infectados com 10^6 EI de PbA foram expostos, ou não, à HBO (100% O_2 , 3 ATA), diariamente por 2 horas entre os dias 4-7 pós-infecção: as curvas de sobrevivência dos dois grupos (n=10) foram comparadas. Teste de Log-rank: $P = 0.003$ exposto entre os dias 4-10; após a infecção vs não- exposto. (■) Período de manifestação dos sintomas neurológicos de MC.

Figura 16:



HBO apresenta efeito antiparasitário mesmo quando administrado após o estabelecimento da infecção. Nível de parasitemia de camundongos infectados com 10^6 EI de PbA diariamente expostos ($n=10$), ou não ($n=10$) à HBO durante 2 h a partir do dia 4 até o dia 7 (100% O_2 , 3 ATA). Os resultados são expressos como a média de cada grupo de camundongos \pm o desvio padrão. Resultados representam um de três ensaios. (*) e (**) representam respectivamente $P < 0.05$ e $P < 0.005$; exposto vs não-exposto.

6. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados indicam que animais infectados com PbA toleram bem a terapia diária de 1 hora com HBO (100% O₂, 3 ATA) do dia 0 ao dia 10 pós-inoculação, apresentando uma significativa diminuição no desenvolvimento de MC e conseqüentemente uma redução (50%) na taxa de mortalidade quando comparados ao grupo controle (não exposto). Além disso, demonstramos que a exposição dos animais à HBO por 2 horas diárias iniciada a partir do dia 4 (quando a parasitemia já é patente) e seguindo até o dia 7, também promove um retardo no aparecimento dos sintomas e na morte quando comparado ao grupo controle.

Efeitos neuroprotetores da HBO têm sido reportados em inúmeros trabalhos. Em modelo experimental de lesão cerebral, coelhos expostos à HBO (100%, 2,5 ATA) por 90 minutos durante 3 dias consecutivos, apresentam uma significativa redução de edema e necrose cerebral (Niklas *et al.*, 2004). O tratamento da HBO também tem se mostrado eficiente na diminuição do processo isquêmico localizado provocado pela oclusão da artéria cerebral de ratos (Veltkamp *et al.*, 2005a) e pela diminuição dos danos a barreira hemato-encefálica, redução da apoptose e dos níveis de oxidação lipídica (Schabitz *et al.*, 2004; Veltkamp *et al.*, 2005a; Veltkamp *et al.*, 2005b; Yin *et al.*, 2003).

Outros trabalhos indicam que esse efeito protetor da HBO contra a isquemia e hemorragia cerebral deve estar relacionado com a melhora no fornecimento de oxigênio, a diminuição do processo inflamatório (revisto por Al-Waili *et al.*, 2005), da expressão de HIF-1 α e da expressão do fator pró-apoptótico BNIP-3 (Li *et al.*, 2005; Ostrowski, 2005).

Estudo realizado em humanos com lesões cerebrais e expostos diariamente à HBO por 1 hora aponta o aumento do fornecimento de oxigênio no cérebro e a redução nos níveis de lactato no líquido cérebro-espinhal (Rockswold *et al.*, 2001). Outro estudo mostra uma melhora nas funções motoras de 10 entre 22 pacientes com infarto cerebral e

expostos à HBO, além disso, observou-se também, revascularização em 7 desses pacientes (Kapp *et al.*, 1981).

Como foi demonstrado, a exposição dos camundongos infectados ao oxigênio 100% pressurizado a 1 ATA (pressão atmosférica) não foi suficiente para promover a melhora dos sintomas de MC, indicando que a diminuição na mortalidade e a redução da parasitemia dependem da exposição de 100% de oxigênio e de uma pressão maior que a atmosférica.

De fato, outros trabalhos apontam para a necessidade do uso simultâneo da pressão e do oxigênio. Pacientes com MC em estado de coma, expostos à 95% de oxigênio não pressurizado, não apresentaram melhoras nos sintomas e nos níveis de consciência (Warrell *et al.*, 1988). Da mesma forma, o uso de 100% oxigênio 1 ATA em modelo experimental de isquemia não resultou em proteção neuronal (Veltkamp *et al.*, 2005a, Veltkamp *et al.*, 2005b). Os mecanismos responsáveis pela neuroproteção provocada pela exposição à HBO em casos MC ainda não estão claros.

Análises imunohistoquímicas *post-mortem* de cérebros de crianças e adultos, vítimas de malária cerebral, revelaram alterações nas junções celulares nos sítios de citoadesão de EI; e ainda notou-se em pacientes com MC a expressão de altos níveis de marcadores imunológicos, nos macrófagos cerebrais, os quais normalmente não são expressos (Medana e Turner, 2006). Além disso, pacientes com MC também revelam altos níveis de citocinas próinflamatórias como IFN- γ , IL-1 β e TNF- α no plasma (De Kossodo e Grau, 1993; Peyron *et al.*, 1994), o que possivelmente está relacionado ao aumentando da expressão de ICAM-1, envolvido na adesão de EI e leucócitos no endotélio cerebral (Beremdt *et al.*, 1989; Craig e Scherf, 2001; Grau e De Kossodo, 1994; Miller *et al.*, 1989).

Estudos utilizando modelos experimentais de MC apontaram para uma migração de células TCD8+ para o cérebro, sugerindo a sua participação no surgimento dos

sintomas e na morte associada à MC (Belnoue *et al.*, 2002; Nitcheu *et al.*, 2003; Pino *et al.*, 2005; Renia *et al.*, 2006). Além disso, a adesão de eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* nas células endoteliais humanas pode induzir a apoptose nas células endoteliais (Pino *et al.*, 2003). Dessa maneira, acredita-se que a citotoxicidade e a indução da apoptose contribuam para a quebra da barreira hemato-encefálica, e consequentemente no desenvolvimento de MC.

Estes achados, associados ao fato do oxigênio pressurizado inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, diminuir a expressão de ICAM-1, inibir a sequestração de células imunocompetentes, promover a diminuição do fator de indução da apoptose e a expressão de HIF- α , além de provocar o aumento na expressão de VEGF, fator relacionado a angiogênese (Al-Waili *et al.*, 2006; Benson *et al.*, 2003; Buras *et al.*, 2000; Lahat *et al.* 1995, Lee *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005; Miljkovicolic *et al.*, 2003; Ostrowski, 2005; Sheikh *et al.*, 2000; Yamashita e Yamashita, 2000 e Yang *et al.*, 2001), sugerem que alguns desses mecanismos (de uma maneira não excludente) possam estar envolvidos com os efeitos neuroprotetores induzidos pela exposição à HBO. A fim de verificarmos quais desses mecanismos estão envolvidos na melhora da patogênese da MC, novos experimentos serão realizados posteriormente.

O grau de integridade da BHE dos animais expostos diariamente ou não à HBO foi quantificado no dia 7 pós-infecção (pico de sintoma e morte) e demonstrou que a terapia com oxigênio hiperbárico é eficiente na prevenção da degradação da barreira hemato-encefálica. Tais achados corroboram com os resultados observados em ratos e camundongos após oclusão da artéria cerebral mediana submetidos a condições hiperbáricas (100%, 3 ATA) por 1 hora, e que apresentaram uma significativa redução da permeabilidade da BHE (Veltkamp *et al.*, 2005b). No entanto, nesse mesmo trabalho, a administração de 100% de oxigênio a 1 ATA (pressão atmosférica) não foi capaz de prevenir a quebra da BHE em ratos com isquemia.

Como pode ser observado, os camundongos infectados com PbA e expostos à HBO diariamente a partir do dia zero da infecção ou a partir do dia 4 pós-infecção tiveram uma redução significativa da parasitemia, em relação ao controle, nos primeiros dias de pós-infecção (dias 4, 5 e 6). Este efeito antiparasitário, no entanto, não foi notado em animais infectados com Pch AS e expostos à HBO (100%, 3 ATA, 1h/dia), exceto no dia 3 pós-infecção. Acreditamos que as razões do efeito antiparasitário induzido pela HBO em animais infectados por PbA ou Pch esteja relacionado com o grau de infectividade destas duas espécies de parasitas, porém, a razão para esta discrepância ainda não está clara.

Alterações nos níveis de parasitemia já foram anteriormente reportados no tratamento de animais infectados com 5×10^4 de *P. berghei berghei*, após a exposição à 100% de oxigênio durante 75 minutos (3 ATA) (Rencricca *et al.*, 1981). De maneira semelhante, recentes trabalhos apontam para a redução do tamanho da lesão e da parasitemia causada por *Leishmania amazonensis* após a exposição diária dos camundongos infectados a 100% de oxigênio a 2,5 ATA (Arrais-Silva *et al.*, 2006).

Dessa maneira tais resultados sugerem que os efeitos da HBO dependem do tipo de parasita exposto, de sua virulência, da dose de infecção e do tempo total do tratamento.

As análises *In vitro* realizadas com hemácias sadias, ou infectadas expostas à HBO (100%, 3 ATA) por 6 horas, mostram que esta terapia não é prejudicial a essas células, não alterando significativamente a densidade de eritrócitos e nem reduzindo, ou inibindo a infectividade do *Plasmodium berghei* ANKA. Estes resultados, no entanto, se mostram, contrários ao que foi visto por Arrais-Silva *et al.* (2005) durante a exposição direta de oxigênio hiperbárico em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, onde se observou a inibição de sua proliferação através da diminuição da suscetibilidade de macrófagos infectados. Entretanto, os níveis de parasitemia dos EI expostos à HBO e das

não expostos apresentaram uma queda significativa em relação aos níveis iniciais, porém essa queda se mostrou menos pronunciada nas hemácias expostas à HBO.

Sabe-se que a exposição à HBO aumenta os níveis de intermediários reativos de oxigênio (ROI) (Hink *et al.*, 2001), desta maneira acredita-se que a disparidade encontrada entre esses dois protozoários, em relação à exposição ao oxigênio hiperbárico, esteja relacionada ao modo diferenciado de morte mediado por ROI. De fato enquanto o parasita da *Leishmania* é sensível à exposição ao ROI, os eritrócitos infectados são resistentes à morte por ROI mesmo em doses supra fisiológicas, além disso, o ROI não é essencial no controle da parasitemia de *P. c. chabaudi*. (Gillman *et al.*, 2004; Liew *et al.*, 1997; Reiner *et al.*, 1994; Sobolewski *et al.*, 2005).

Outro aspecto a ser ressaltado, é o efeito dúbio que a exposição da HBO pode provocar dependendo da dose. A exposição de monócitos-macrófagos humanos por 90 minutos inibiu a síntese de IL-1 β e TNF- α , no entanto nenhum efeito foi encontrado após 3 horas de exposição. Porém, após 12 horas de HBO, um efeito contrário ao notado com tratamento de 90 minutos é observado, provocando o aumento nos níveis de IL-1 β (Benson *et al.*, 2003).

Sendo assim, os dados aqui apresentados abrem novas perspectivas no tratamento da malária cerebral, podendo a HBO ser utilizado como terapia principal ou como adjuvante de drogas neuroprotetoras e anti-inflamatórias já utilizadas no tratamento contra MC.

6. CONCLUSÕES

- 1) A oxigenação hiperbárica é capaz de reduzir significativamente a taxa de mortalidade associada à malária cerebral murina.
- 2) Animais infectados com *P.berghei* ANKA e expostos a HBO apresentaram menor variação de temperatura e uma redução da parasitemia.
- 3) HBO não induz anemia nos camundongos infectados.
- 4) A exposição ao oxigênio 100% não promove a redução dos sintomas associados a MC e conseqüentemente a morte.
- 5) A exposição direta a HBO não tem efeitos deletérios em hemácias sadias.
- 6) A exposição direta de HBO não afeta diretamente os EI infectados com PbA e nem alteram a sua habilidade de induzir malária cerebral.
- 7) O tratamento terapêutico com HBO retarda o aparecimento dos sintomas neurológicos da malária cerebral e morte associada.
- 8) O tratamento com oxigênio hiperbárico é eficaz na prevenção da degradação da barreira hemato-encefálica

BIBLIOGRAFIA

- ALONSO, P L.; SACARLAL,J.; APONTE, J.J.; LEACH,A.; MACETE,E.; AIDE, P.; SIGAUQUE, B.; MILMAN,J ; MANDOMANDO,I.; BASSAT, Q.; GUINOVART,C.; ESPASA, M.; CORACHAN,S.; LIEVENS, M.; NAVIA, MM ; DUBOIS, M., MENENDEZ,C.; DUBOVSKY, F.; COHEN, J.; THOMPSON, R; BALLOU, R., 2005. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomized controlled trial. *The Lancet*, 366: 2012–2018.
- AL-WAILI NS, BUTLER G.J., BEALE J., ABDULLAH M.S., HAMILTON R.W.B., LEE B.Y., LUCUS P., ALLEN M.W., PETRILLO R.L., CARREY Z., FINKELSTEIN M. 2005. Hyperbaric oxygen in treatment of patients with cerebral stroke, brain trauma, and neurological disease. *Adv Therapy*. 22: 659-678.
- AMINO R., THIBERGE S., MARTIN B, CELLI S, SHORTE S., FRISCHKNECHT F, MÉNARD R., 2006a. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature*. 12: 220-224.
- ARRAIS-SILVA WW, COLLHONE MC, AYRES DC, SOUTO PCS, GIORGIO S. 2005. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Parasitol Inter*. 54: 1-7.
- ARRAIS-SILVA WW, PINTO EF, ROSSI-BERGMANN B, GIORGIO S. 2006. Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissue lesions in mice. *Acta Trop*. 98:130-6.
- BELNOUE E, KAYIBANDA M, VIGARIO AM, DESCHEMIN JC, VAN ROOIJEN N, VIGUIER M, SNOUNOU G, RENIA L. 2002. On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J. Immunol*. 169: 6369-75.

- BENSON RM, MINTER LM, OSBORNE BA, GRANOWITZ EV. 2003. Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages. *Clin Exp Immunol.* 134:57-62.
- BEREMDT AR, SIMMONS DL, TANSEY J, NEWBOLD CL, MARSH K. 1989 Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 341: 57-59.
- BURAS JA., STAHL GL, SVOBODA KKH., REENSTRA, W.R. 2000. Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278: 292-302.
- CARNEY C K, SCHRIMPE A C, HALFPENNY K, HARRY R S, MILLER C M, BRONCEL M, SEWELL S L, SCHAFF J E, DEOL R, CARTER M D, WRIGHT D W 2006. The basis of the immunomodulatory activity of malaria pigment (hemozoin). *J Biol Inorg Chem* 11:917–929
- CHAKRAVORTY SJ. & CRAIG A. 2005. The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Eur. J. Cell Biol.* 84:15-27.
- CLARK LA; MONN RE. Hyperbaric oxygen in the treatment of life-threatening soft-tissue infections.1999. *Resp. Care Clin. N. America* 5: 203-219.
- CRAIG A, SCHERF A., 2001. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol.* 115:129-43.
- COMBES V., COLTEL N., FAILLE D., WASSMER SC., GRAU GE., 2006. cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain-barrier. *Int. J. Parasitol.* 36: 541-546.
- COSTA FTM, NOGUEIRA PA, GYSIN J.,2006. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and the infected placenta: a two-way pathway. *Braz J. Med Biol. Res* 39: 1525-1536.

- DAILY, J.P. Antimalarial drug therapy: The role of parasite biology and drug resistance. 2006 *J. Clin. Pharmacol.* 46: 1487-1497.
- DAVID PH, HOMMEL M, MILLER LH, UDEINYA IJ, OLIGINO LD., Parasite sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. 1983. *Proc Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 5075-9.
- DE KOSSODO & GRAU GE. 1993. Role of cytokines and adhesion molecules in malaria immunopathology. *Stem Cells.* 11: 41-48.
- DUFFY PE & FRIED M. 2005. Malaria in the pregnant woman. *Curr Top Microbiol Immunol.* 295:169-200.
- ENGWERDA C, BELNOUE E, GRUNER AC, RENIA L. 2005. Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 297:103-43
- ESAMAI F, ERNERUDH J, JANOLS H, WELIN S, EKERFELT C, MINING S, FORSBERG P. 2003. Cerebral malaria in children: serum and cerebrospinal fluid TNF-alpha and TGF-beta levels and their relationship to clinical outcome. *J Trop Pediatr.* 49:216-23
- GARCIA-COVARRUBIAS AND SANCHEZ-RODRIGUEZ, 2000. Hyperbaric oxygenation therapy, basic concepts. *Gac Med Mex* 136: 45-56
- GRAU GE & DE KOSSODO S. 1994. Cerebral malaria: mediators, mechanical obstruction or more? *Parasitol Today* 10: 408-9.
- GRAU, G. MACKENZIE C.D., CARR R.A, REDARD M.,PIZZOLATO G., ALLASIA C., CATALDO C., TAYLOR T.E, MOLYNEUX M.E., 2003. Platelets accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* 187:461-466.
- GREENWOOD B M, BOJANG K, WHITTY C J M, TARGETT G A T., 2005, Malaria. *Lancet* 365: 1487–98.

- GROTE CL, PIERRE-LOUIS SJ, DURWARD WF. 1997. Deficits in delayed memory following cerebral malaria: a case study. *Cortex*. 33:385-8
- GUDEWICZ TM; MADER JT, DAVIS CP. 1987. Combined effects of hyperbaric oxygen and antifungal agents on the growth of *Candida albicans*. *Aviat. Space Environ. Med.* 58: 673-678.
- HAY SI, GUERRA CA, TATEM AJ, NOOR AM, SNOW RW. 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. *Lancet Infect Dis* 4: 327-336.
- HEARN J, RAYMENT N, LANDON DN, KATZ DR, DE SOUZA JB. 2000. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature *Infect Immun.* 68:5364-76.
- HELMS A.K., WHELAN H.T., TORBEY M.T., 2005. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis.* 20: 417-426.
- HINK J., JANSEN E., 2001. Are superoxide and/or hydrogen peroxide responsible for some of the beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy? *Med Hypotheses* 57, 764-769.
- HOFFMAN, S. L., 2006. Malaria: A protective paradox. *Nature.* 444: 824-827
- HOLDING P.A., STEVENSON J. PESHU N., MARSH K. 1999. Cognitive sequelae of severe malaria with impaired consciousness. *Soc. Trop. Med Hyg.* 93:529-534.
- HUNT NH. & GRAU GE. 2003. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 24: 491-499.
- IDRO R., JENKINS N.E., NEWTON C.R.J., 2005. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcomes of cerebral malaria. *The Lancet.* 4:827-840.
- JENNINGS VM, ACTOR JK, LAL AA, HUNTER RL. 1997. Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. *Infect Immun.* 65:4883-7.

- KAISER K., TEXIER A., FERRANDIZ J., BUGUET A., MEILLER A., LATOUR C., PEYRON F., CESPUGLIO R., PICOT S. 2006. Recombinant human erythropoietin prevents the death of mice during cerebral malaria. *J. Infect Dis.* 193: 987-995.
- KAPP J.P., 1981. Neurological response to hyperbaric oxygen- a criterion for cerebral revascularization. *Surg Neurol.* 15: 43-46.
- KINDALL EP., A history of hiperbaric medicine: In Kindall EP, Whelan Ht (eds): Hiperbaric Medicine Practice. *Flagstaff, Best Publishing, 1999.*
- KWIATKOWSKI D. AND MARSH K., 1997. Development of a malaria vaccine. *The Lancet* 350:1696-1701.
- LAHAT N, BITTERMAN H, YANIV N, KINARTY A, BITTERMAN N. 1995. Exposure to hyperbaric oxygen induces tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) secretion from rat macrophages. *Clin Exp Immunol.* 102:655-9.
- LE BRAS, J., DURAND, R., 2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* 17, 147-153.
- LEE CC, CHEN SC, TSAI SC, WANG BW, LIU YC, LEE HM, SHYU KG. 2006. Hyperbaric oxygen induces VEGF expression through ERK, JNK and c-Jun/AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells. *J Biomed Sci.* 13:143-56.
- LIEW F.Y., WEI X.Q., PROUDFOOT L., 1997. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 1311-1315.
- LI Y, ZHOU C, CALVERT JW, COLOHAN AR, ZHANG JH. 2005. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model. *Exp Neurol.* 191:198-210.
- LOMAR AV, VIDAL JE, LOMAR FP, BARBAS CV, MATOS GJ, BOULOS M. 2005. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review *Braz J Infect Dis.* 9:425-30.

- LOU J, LUCAS R, GRAU G. 2001. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol. Rev.* 14: 810-820.
- MACKINTOSH, L., BEESON, J.G., MARSH, K., 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in Parasitology.* 20: 597-603.
- MACPHERSON GG, WARRELL MJ, WHITE NJ, LOOAREESUWAN S, WARRELL DA. 1985. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am. J. Pathol.* 119: 385-401.
- MAKKAR RP, MUKHOPADHYAY S, MONGA A, GUPTA AK. 2002. *Plasmodium vivax* malaria presenting with severe thrombocytopenia *Braz J Infect Dis.* 6:263-5.
- MARSH, K., 1998. Malaria disaster in Africa. *Lancet.* 352:924-925.
- MCGREADY R, DAVISON BB, STEPNIEWSKA K, CHO T, SHEE H, BROCKMAN A, UDOMSANGPETCH R, LOOAREESUWAN S, WHITE NJ, MESHNICK SR, NOSTEN F. 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 70:398-407.
- MEDANA I.M. & TURNER G.D., 2006. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int. J. Parasitol.* 36: 555-568.
- MEDANA I.M. et al., 1997. Tumor necrosis factor- α expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am. J. Pathol.* 150: 1473-1486.
- MILJKOVI-LOLIC, M.; SILBERGLEIT, R.; FISKUM, G.; ROSENTHAL, RE. 2003. Neuroprotective effects of hiperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity. *Brain Res.* 971: 90-94.
- MILLER KL, SILVERMAN PH, KULLGREN B, MAHLMANN LT. 1989. Tumor necrosis factor α and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun* 57:1542-1546.

- MILLER,L.H.; BARUCH,D.I.; MARSH, K.; DOUMBO,O.K., 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 415:673-679.
- NEILL AL & HUNT NH. 1992. *Parasitol*. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice 105:165-75.
- NEWTON CRJC, KRISHNA S. 1998. Severe *falciparum* malaria in children: Current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther* 79:1-53.
- NEWTON CRJC, HIEN T.T., WHITE N., 2000. NEUROLOGICA ASPECTS OF TROPICAL DISEASE: CEREBRAL MALARIA. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry* 69:0433-441
- NIKLAS A., BROCK D., SCHOBER R., SCHULZ A., SCHNEIDER D. 2004. Continuous measurements of cerebral tissue oxygen pressure during hyperbaric oxygenation- HBO effects on brain edema and necrosis after severe brain trauma in rabbits. *J. Neurological Sciences*, 219: 77-82.
- NITCHEU J, BONDUELLE O, COMBADIÈRE C, TEFIT M, SEILHEAN D, MAZIER D, COMBADIÈRE B. 2003. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis *Immunol*. 170:2221-8.
- NOSTEN F, MCGREADY R, SIMPSON JA, THWAI KL, BALKAN S, CHO T, HKIRIJAROEN L, LOOAREESUWAN S, WHITE NJ. 1999. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet*. 354:546-549.
- OSTROWSKI, RP; COLOHAN, ART; ZHANG, JH. 2005. Mechanisms of therapeutic of oxygen-induces neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *J.Cereb. Blood Flow Metab*. 25: 554-571.
- OZEN M, GUNGOR S, ATAMBAY M, DALDAL N. 2006. Cerebral malaria owing to *Plasmodium vivax*: case report. *Ann Trop Paediatr*. 26:141-4.

- PANTAKAR TF, KARNAD DR., SHETTY P.G., DESAI A.P., PRASAD S.R., 2002. Adult cerebral malaria: prognostic importance of imaging findings and correlation with Postmortem findings. *Radiology*. 224: 811-816.
- PARK M.K., MYERS R.A., MARZELLA L., 1992. Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin Infect Dis* 14: 720-740.
- PENET M.F., VIOLA A., CONFORT-GOUNY S., LE FUR Y., DUHAMEL G., KOBER F., IBARROLA D., IZQUIERDO M., COLTEL N., GHARIB B., GRAU G.E., COZZONE P.J., 2005. Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci*. 25: 7352-7358.
- PEYRON F., BURDIN N., RINGWALD P., VUILLEZ J.P., ROUSSET F., BANCHEREAU J., 1994. High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin Exp Immunol*. 95: 300-303.
- PIGUET P.F., KAN C.D., VESIN C., ROCHAT A., DONATI Y., BARAZZONE C., 2001. Role of CD40-CVD40L in mouse severe malaria. *Am J Pathol*. 159: 733-742.
- PINO P., TAOUFIQ Z., NITCHEU J., VOULDOUSKIS I., MAZIER D., 2005. Blood-baris barrier breakdown dureing cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost*. 94: 336-340.
- PONGPONRATN E, RIGANTI M, PUNPOOWONG B, AIKAWA M. 1991. Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 44: 168-175.
- PRAKASH D, FESEL C, JAIN R, CAZENAVE PA, MISHRA GC, PIED S. 2006. Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis*. 194:198-207.
- REINER S.L., ZHENG S., WANG Z.E., STOWRING L., LOCKSLEY R.M., 1994. Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages

- and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection. *J Exp Med* 179, 447-456.
- RENCRICCA N.J., COLEMAN R.M., ALTSCHULE M.D., FALETRA P.P., GRAY A.D., DESROCHERS P.E., DOYLE M.J., 1981. Quantification of hyperbaric oxygen-induced toxicity utilizing a malarial system. *Aviat Space Environ Med.* 52: 85-87.
- RENIA L, POTTER SM, MAUDUIT M, ROSA DS, KAYIBANDA M, DESCHEMIN JC, SNOUNOU G, GRUNER AC. EPUB, 2006. Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* 36: 547-54.
- ROCKSWOLD SB, ROCKSWOLD GL, VARGO JM, et al. 2001 Effects of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients. *J Neurosurg.*; 94:403-411.
- ROGATSKY GG, KAMENIR Y, MAYEVSKY A. 2005. Effect of hyperbaric oxygenation on intracranial pressure elevation rate in rats during the early phase of severe traumatic brain injury. *Brain Res.* 1047:131-6.
- SCHABITZ WR, SCHADE H, HEILAND S, KOLLMAR R, BARDUTZKY J, HENNINGER N, MULLER H, CARL U, TOYOKUNI S, SOMMER C, SCHWAB S., 2004. Neuroprotection by hyperbaric oxygenation after experimental focal cerebral ischemia monitored by MRI. *Stroke.* 35:1175-9.
- SCHOFIELD L, GRAU GE. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Reviews Immunology.* 5: 722-735.
- SHEIKH AY, GIBSON JJ, ROLLINS MD, HOPF HW, HUSSAIN Z, HUNT TK. 2000. Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. *Arch Surg.* 135:1293-7.
- SOARES, I.S. E RODRIGUES, M.M., 1998. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. *Malaria vaccine. Braz J. Med Biol. Res* h. 31: 317-332

- SOBOLEWSKI P., GRAMAGLIA I., FRANGOS J.A., INTAGLIETTA M., VAN DER HEYDE H., 2005. *Plasmodium berghei* resists killing by reactive oxygen species. *Infect Immun* 73, 6704-6710.
- STURM A, AMINO R, VAN DE SAND, REGEN T., RETZLAFF S., RENNENBERG A., KRUEGER A., POLLOK J.M., MENARD R. HEUSSLE V.T. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Scienceexpress*. 1-8.
- SUKOFF MH, RAGATZ RE. 1982; Hyperbaric oxygenation for the treatment of acute cerebral edema. *Neurosurgery*. 10:29-38.
- TRAMPUZ A., JEREB M., MUZLOVIC I., PRABHU R.M., 2003. Clinical review: severe malaria. *Critical Care* 7:315-323.
- TURNER G. 1997. Cerebral malaria *Brain Pathol*. 7: 569-582.
- VAN DER HEYDE, H.C., NOLAN J., COMBES V., GRAMAGLIA I., GRAU, G. 2006. A unified hipótesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostais leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitology*. 22:503-508.
- VELTKAMP R., SIEBING D.A., HEILAND S., SCHOENFFELDT-VARAS P., VELTKAMP C., SCHWANINGER M., SCHWAB S., 2005a. Hyperbaric oxygen induces rapid protection against focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1037: 134-138.
- VELTKAMP R., SIEBING D.A., SUN L., HEILAND S., BIEBER K., MARTI H.H., NAGEL S., SCHWAB S., SCHWANINGER M., 2005b. Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 36: 1679-1683.
- WAHLGREN, M., CARLSON, J., UDOMSANGPETCH, R., PERLMANN, P., 1991. Why do *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous rosettes. *Parasitol Today*. 5: 183-185.

- WARRELL DA, WHITE NJ, VEAL N, LOOAREESUWAN S, CHANTHAVANICH P, PHILIPIS RE, KARBWANG J, PONGPAEW P, KRISHNA S. 1988. Cerebral anaerobic glycolysis and reduced cerebral oxygen transport in human cerebral malaria. *Lancet*. 2: 534-538.
- WASSMER S.C., COMBES V., GRAU G.E., 2003. Pathophysiology of cerebral malaria: role of host cells in the modulation of cytoadhesion. *Ann N Y Acad Sci*. 992: 30-38.
- WHITE NJ, WARRELL DA, LOOAREESUWAN S, CHANTHAVANICH P, PHILIPIS RE, PONGPAEW P. 1985. Pathophysiological and prognostic significance of cerebrospinal-fluid lactate in cerebral malaria. *Lancet*. 1: 776-778.
- WIESE L, KURTZHALS JA, PENKOWA M. 2006. Neuronal apoptosis, metallothionein expression and proinflammatory responses during cerebral malaria in mice. *Exp Neurol*. 200:216-226.
- WINTER G., CHEN Q., WAHLGREN M. 2000. Meetingreport: the molecular background of severe and complicated malaria. *Mol Biochem*. 407:1018-1022.
- YAMASHITA M & YAMASHITA M. 2000. Hyperbaric oxygen treatment attenuates cytokine induction after massive hemorrhage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278: E811-6.
- YANG ZJ, BOSCO G, MONTANTE A, OU XI, CAMPORESI EM. 2001. Hyperbaric O₂ reduces intestinal ischemia-reperfusion-induced TNF-alpha production and lung neutrophil sequestration. *Eur J Appl Physiol*. 85:96-103.
- YIN W, BADR AE, MYCHASKIW G, ZHANG JH. 2002. Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model. *Brain Res*. 926:165-71.
- ZHANG JH, LO T, MYCHASKIW G, COLOHAN A. 2005. Mechanisms of hyperbaric oxygen and neuroprotection in stroke. *Pathophysiology*. 12:63-77.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATA	Atmosferas absolutas
BHE	Barreira hemato-encefálica
BNIP	Fator pró apoptótico
CSA	Condroitina sulfato A
EI	Eritrócitos Infectados
HA	Ácido hialurônico
HIF	Fator de Indução de hipóxia
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
MB	Malária branda
MC	Malária cerebral
MCM	Malária cerebral murina
MG	Malária gestacional
MS	Malária severa
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PchAS	<i>Plasmodium chabaudi</i> AS
ROI	Intermediários reativos de oxigênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

ANEXO I
(artigo submetido)

HYPERBARIC OXYGEN PROTECTS AGAINST EXPERIMENTAL CEREBRAL MALARIA

Running title: Hyperbaric oxygen in ECM

Yara C. Blanco^{1,2}, Stefanie C. P. Lopes^{1,2}, Wagner W. Arrais-Silva², Bruna O. Carvalho^{1,2}, Rogério Amino³, Selma Giorgio² and Fabio T. M. Costa^{1,2,*}

¹Department of Microbiology & Immunology. State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP- Brazil.

²Department of Parasitology. State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

³Department of Biochemistry. Federal University of São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil.

Key words: Neuroprotection, Hyperbaric oxygen, Experimental cerebral malaria, *Plasmodium berghei* ANKA.

***Corresponding author:** Dr. Fabio T. M. Costa, Department of Microbiology & Immunology. State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, P.O. Box 6109; 13083-862. Brazil. Tel. (+55) 19 35216271, E-mail: costaftm@unicamp.br

ABSTRACT

Background: Cerebral malaria (CM) is a syndrome characterized by neurological signs, seizures and coma. Despite the fact that CM presents similarities with cerebral stroke, few studies have focused on the evaluation of new supportive therapies. Hyperbaric oxygen (HBO) therapy has been successfully used in patients with numerous brain disorders such as; brain stroke, migraine and atherosclerosis.

Methods: C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) were exposed to daily doses of HBO (100% O₂, 3.0 ATA, 1-2h per day) before or after parasite establishment.

Results: Cumulative survival analyses demonstrated that HBO therapy (100% O₂, 3.0 ATA), protects 50% of PbA-infected mice in conditions well tolerated by humans and animals, and delayed CM specific neurological signs, when administrated after patent parasitemia. This was probably due to the reducing of mice brain-blood-barrier (BBB) dysfunction and hypothermia. Despite some effects on parasitemia levels early in infection, it is unlikely that HBO has a direct effect on parasite survival and infectivity, as demonstrated by *in vitro* assays.

Conclusions: The data presented here is the first indication that HBO treatment could be used as a supportive therapy, perhaps in association with neuroprotective drugs, to prevent CM clinical outcomes, including death.

INTRODUCTION

Cerebral malaria (CM) causes 1-2 million deaths annually; mainly in sub-Saharan African children aged 2-6 years. It is estimated that 250,000 children that do not succumb to CM will develop neurocognitive impairments per year [1], and most CM patients die before the beneficial effects of drug treatment are observed [2]; thus indicating the need to explore new supportive therapies.

CM is a multi-factorial syndrome characterized by neurological signs, seizures and coma, which can, in turn, lead to death. This syndrome can be associated with a loss of cerebrospinal fluid spaces and ischemia [3], alterations in cerebral blood flow velocity [4], decrease in cerebral oxygen consumption in CM comatose patients [5] and an increase in the lactate levels in the cerebrospinal fluid [6] which decreases after patient recovery of consciousness [7]. Recent imaging and postmortem analyses studies revealed the presence of Durck granulomas, blood-brain-barrier (BBB) dysfunction and diffuse cerebral edema with multiple petechial hemorrhages and ischemic changes in the brain of adults with CM [8-9].

Although the CM pathogenic process is controversial and still not fully understood, several bodies of evidence suggest that the host immune system plays a major role through the expression of certain cytokines and activation of immunocompetent cells [10-11]. In fact, recent immunological analyses have shown that, unlike individuals with mild and severe noncerebral malaria, CM patients presented elevated levels of a specific cluster of cytokines, which include TGF- β , TNF- α , IL-10 and IL-1 β [12].

Hyperbaric oxygen therapy (HBO; pO₂ 760 mmHg) has been successfully used against bacterial and fungal infections and as an adjunct therapy in surgeries [13-14]. However, a large body of evidence has recently shown that HBO therapy transiently suppress the inflammatory process [15]. Indeed, immunological analyses revealed that HBO therapy significantly decreases levels of TNF- α and IL-1 β secreted by monocytes

and macrophage collected from rats or from human peripheral blood after stimulation with LPS [16-17]. In an experimental model for ischemia, HBO reduces immunocompetent cell sequestration and the synthesis of TNF- α [18]; probably by decreasing ICAM-1 expression levels [19]. Moreover, HBO reduces expression of the cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA, an enzyme involved in inflammation, and the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), a transcriptional factor associated with low oxygen concentrations (<2%) [20,21]. HBO therapy has been used in patients with numerous brain disorders such as; brain stroke, migraine and atherosclerosis, due it capacity to decrease cerebral edema, brain infarction, maintaining BBB integrity, reducing neuronal death and improving blood flow in brain damaged areas [22]

In an early study it was observed that HBO could alter parasitemia levels of mice infected with a non-cerebral line of *Plasmodium berghei* [23]. However, the HBO effect on the entire curve of parasitemia, on the clinical symptoms and the mechanisms involved were not further investigated. Moreover, although the pathological process involved in CM displays some features in common with brain stroke, the effect of HBO against CM, to our knowledge, was never assessed. Herein, we show that HBO therapy, in conditions also suitable for human use, prevents CM clinical symptoms in C57BL/6 mice infected with *P. berghei* ANKA (PbA), a widely used experimental cerebral malaria (ECM) model [24].

METHODS

Mice

C57BL/6 mice (7-10 week-old) were purchased from University of São Paulo (São Paulo, SP, Brazil) and maintained in our specific pathogen-free animal facility. All experiments and procedures were approved by the UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (protocol n° 857-1).

Parasites, parasitemia, temperature and red blood cell density assessment

Two different lines of *Plasmodium* were used: the cloned line of *P. berghei* ANKA (PbA) and *P. chabaudi chabaudi* AS (Pch) which were kindly provided by Dr. Laurent Rénia (Institut Cochin, INSERM U567, Paris, France) and by Dr. Hernando Del Portillo (Department of Parasitology, ICB, USP, São Paulo, SP, Brazil), respectively. The blood stage forms of both parasites were stored in liquid nitrogen after *in vivo* passages in C57BL/6 mice according to the protocol described elsewhere [24]. Mice were infected intraperitoneally (i.p.) with 10^6 infected red blood cells (iRBC) and the neurological signs for CM were monitored. Percentage of parasitemia was determined by counting the number of iRBC in at least 1,000 erythrocytes in Giemsa-stained blood smears.

In PbA-infected mice the corporal temperature and the density of red blood cells ($n^\circ \text{RBC} / \text{mL} \times 10^9$) were evaluated daily, starting on day -1 post-infection, by rectal introduction of a precision digital thermometer (model TE-300, Instrucamp, Brazil), and with the aid of a Neubauer chamber, respectively. In the *in vitro* assays, RBC were counted from 0 hour. The percentage of RBC relative to day -1 post-infection or to 0 hour was calculated with the following formula: $(n^\circ \text{RBC per mL} \times 10^9 \text{ of a determined day post-infection or hour} / n^\circ \text{RBC per mL} \times 10^9 \text{ on day -1 post-infection or at 0 h}) \times 100$.

Hyperbaric oxygen treatment

Groups of 8-10 PbA-infected mice were exposed daily to 100% oxygen at a pressure of 3.0 atmospheres (ATA) for 1 h per day in a hyperbaric animal research chamber (Research Chamber, model HB 1300B, Sechrist, Anaheim, CA, USA) from day 0 to 10 post-infection (11-day-exposure), or during 2 h from day 4-7 post-infection (4-day-exposure). The chamber was pressurized and decompressed at the rate of 0.5 ATA / min as described elsewhere [25]. For the 11-day-exposure protocol, mice were previously exposed to HBO during 1 h before PbA infection, whereas for the 4-day-exposure protocol

PbA-infected mice were randomly selected and placed into the hyperbaric chamber. To determine the effect of 100% oxygen (hyperoxia), pressurized or not, PbA-infected mice were submitted to the 11-day-exposure protocol, but at 1.0 ATA (normobaric) instead of 3.0 ATA. Infected mice in the control group (non-exposed) were left in an airy room. The temperature inside the hyperbaric chamber was 21°C, the same as in the room, and was measured with the aid of a high pressure resistant thermometer (model TB-0261, Instrucamp, Brazil). For the direct HBO effect assays, normal red blood cells (nRBC) or iRBC were collected from a naïve mouse or a PbA-infected animal on day 6 post-infection (12% parasitemia), then were diluted in RPMI 1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (Hyclone, USA). One mL of nRBC or iRBC (10^7 / mL) were plated in five replicates on a 24 well-plate then exposed to HBO (100% O₂, 3.0 ATA) in a hyperbaric chamber for up to 6 hours.

Brain-blood-barrier dysfunction evaluation

Brain-blood-barrier (BBB) integrity was assessed in PbA-infected mice on day 7 post-infection by i.v. injection of Blue Evans (1% in saline) in the retro-orbital plexus as previously described [26]. One hour after injection, mice brains were extracted and photographed using a digital camera (Nikon, USA). Brain staining was quantified by measuring the brightness intensity using the red channel in a delimited circular area of 12,294 pixels² using with the aid of the ImageJ™ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Brightness intensity of mice brain was inversely proportional to the levels of Blue Evans staining.

Statistical analysis

Statistical significance between control and experimental groups were determined by Log-Rank test for the cumulative survival experiments. The Mann-Whitney *U* test was used to compare parasitemia levels, relative temperature dropping, relative RBC density and BBB integrity among brains collected from both naïve animals and infected mice, treated with HBO or not. Calculations were performed using BioEstat™ version 3.0. (CNPq, Brazil) and Prism™ version 3.02 (GraphPad, USA) softwares. Values were considered significant when $P < 0.05$

RESULTS

Determination of the HBO neuroprotective effects

To evaluate the neuroprotective effect of pressurized oxygen, two groups of 10 mice each were infected with PbA and one group was submitted daily to HBO conditions (100% O₂, 3.0 ATA, 1 hour) during 11 consecutive days. As shown in Figure 1A, 100% of PbA-infected mice, not exposed to HBO, exhibited CM-specific neurological signs within 5 to 8 days after infection, and died of fatal cerebral malaria in the following 24 hours; mostly (80%) dying on day 7 post-infection (p.i.). All animals of this group were dead by day 9 p.i.. Surprisingly, and in sharp contrast to the non-exposed animals, 50% of the mice from the HBO group did not develop CM symptoms and survived. In the HBO group, CM neurological signs began to appear later and the mortality rate increased slowly throughout days 7-10, representing 10, 20, 10 and 10%, respectively, on days 7-10. As expected, in those mice that did not develop CM, parasite burden progressed and mice died as a result of hyperparasitemia (Figure 1B). Of note, 1 animal (10%) died on day 14 and 4 (40%) on day 19 post-infection. Cumulative survival statistical analyses clearly demonstrated a significant ($P = 0.0004$, by Log-Rank test) neuroprotective effect of HBO therapy against ECM.

Since it was shown that HBO therapy inhibits the development of *Leishmania amazonensis* and of a non-cerebral line of *P. berghei* [23,25,27]; we monitored the parasitemia levels of infected mice exposed daily, or not, to HBO (11-day-exposure protocol) for up to 19 days. Thus, we observed that HBO significantly reduced the parasite burden of PbA-infected mice on days 4 ($P = 0.01$, by Mann-Whitney U test), 5 ($P = 0.002$, by Mann-Whitney U test) and 6 ($P = 0.002$, by Mann-Whitney U test), when compared to non-exposed animals (Figure 1B). Since 100% of non-exposed PbA-infected mice died, we decided to evaluate whether this reduction on parasitemia levels noticed in HBO exposed animals could be sustained throughout longer periods. Mice were infected with *P. c. chabaudi* AS (non-cerebral line) and submitted to pressurized oxygen sessions as in the 11-day-exposure protocol (data not shown). As noticed in PbA-infected animals submitted to pressurized oxygen, a significant decrease on *P. c. chabaudi* development was observed earlier in infection, on day 3 ($P = 0.003$, by Mann-Whitney U test). However, in the following days of infection until parasite clearance, HBO did not reduce parasitemia levels. In fact, at the peak of infection (day 7), exposed mice presented higher, though not significant, levels of parasitemia than control animals. Taken together, these data demonstrate that despite HBO affects early in the development of parasite infection, this treatment is not enough to control the parasitemia levels later in infection.

Next, to investigate whether pressurized oxygen could present an effect when parasitemia was patent (4%), we randomly selected half of the PbA-infected mice on day 4 post-infection, and exposed them to daily HBO sessions (100% O₂, 3.0 ATA, 2 hours per day) until day 7 (Figure 2). As expected, non-treated mice started to display CM clinical features early on day 5 and 6 and dying within 20-24 hours on days 5 (10%) and 6 (10%), and mostly (80%) dieing on day 7 p.i.. All mice were dead by day 7. Surprisingly, hyperbaric oxygen significantly delayed ($P = 0.003$, by Log-Rank test) CM specific mortality by up to two days, when compared to non-exposed animals, and reduced the

rate of mortality on day 7 from 80% to 40% (Figure 2). Moreover, two HBO exposed mice (20%) only exhibited CM neurological signs on days 8 and 9, dying within 24 hours on days 9 and 10. This shows that HBO is capable of interfering significantly with the manifestation of the CM clinical symptoms, including death, even when administrated after parasite establishment. As observed in the 11-day-exposure protocol, administration sessions of pressurized oxygen starting on day 4 p.i. in PbA-infected mice reduced significantly the parasitemia levels on days 4-6 (respectively $P = 0.003$, 0.001 and 0.01 , by Mann-Whitney U test; data not shown).

To certify that only pressurized oxygen could induce neuroprotective effects, PbA-infected mice were submitted to the 11-day-exposure protocol, but using 1.0 ATA, as the atmospheric air pressure (Figure 3). Interestingly, in this assay, no significant difference ($P > 0.05$, by Log-Rank test) was observed after cumulative survival analyses between infected animals exposed to HBO-1.0 ATA and the control mice. Of note, most of the non-exposed mice began to exhibit CM symptoms and died earlier than the HBO-1.0 ATA treated animals. Although a minimal beneficial effect was observed after the administration of 100% oxygen (hyperoxia) at normobaric conditions, this was not enough to protect or even delay CM neurological signs; thus demonstrates that the HBO neuroprotective effect does not rely only on the administration of 100% oxygen.

HBO effect on ECM severe symptoms

Severe hypothermia and dysfunction of the brain-blood-barrier (BBB) are common features in ECM [26]. To investigate whether HBO therapy could interfere in the poor ECM outcomes, we measured daily the corporal temperature of PbA-infected mice exposed, or not, to pressurized oxygen in the same conditions as the 11-day-exposure protocol. Interestingly, unlike the non-exposed mice, HBO therapy significantly prevented ($P = 0.0006$, by Mann-Whitney U test) hypothermia in mice from day 6 p.i., when severe

neurological signs were evident in most of the animals (data not shown). Then, by injecting Blue Evans solution, we analysed and quantified the BBB integrity in HBO exposed, non-exposed and in naïve animals early on day 7 p.i.. One hour after Blue Evans injection, mice brains were collected and photographed. As seen in Figure 4A, brains collected from non-exposed mice were darker than those collected from HBO treated animals due to a high incorporation of Blue Evans in the brain tissue as consequence of the BBB destruction [26]. As expected, we did not observe any staining in naïve mice brains. To quantify the Blue Evans staining and, in turn the BBB integrity, we measured the light intensity in naïve animals and infected mice brains submitted, or not, to pressurized oxygen. According to Figure 4B, HBO therapy significantly reduced ($P = 0.0039$, by Mann-Whitney U test) the brain staining in comparison to non-treated infected mice. Moreover, when we compared the Blue Evans staining between naïve and PbA-infected animals HBO treated, no significant difference was observed ($P > 0.05$, by Mann-Whitney U test). As expected, a statistical difference in light intensity levels was observed between naïve mice and non-exposed infected mice ($P = 0.0039$, by Mann-Whitney U test). Taken together, these data clearly demonstrated that HBO prevents temperature drop and BBB dysfunction.

Direct effect of HBO on healthy erythrocytes and PbA-infected red blood cells

Because we observed a significant HBO effected on the parasite burden in the first days of infections, we addressed the question whether pressurized oxygen therapy could damage normal red blood cells (nRBC) or inhibit parasite development directly. Normal RBC, collected from a naïve mouse, were exposed to pressurized oxygen (100% O₂, 3 ATA) during 4 or 6 hours. The relative percentage of nRBC density was not significantly altered ($P > 0.05$, by Mann-Whitney U test) after direct exposure to HBO for up to 6 hours (data not shown); demonstrating that HBO therapy is not toxic to healthy erythrocytes in

these conditions. Next, to evaluate the HBO effect directly on parasite development, iRBC from a PbA-infected mouse were collected and exposed to HBO (100% O₂, 3 ATA). Figure 5A shows a significant reduction ($P < 0.05$, by Mann-Whitney U test) on parasite development, exposed or not to pressurized oxygen, after 4 and 6 hours in comparison to 0 hour. However, when we compared the reduction on parasitemia levels of iRBC left at room air or exposed to HBO, we noticed a significant ($P = 0.01$, by Mann-Whitney U test) and more pronounced reduction on the non-exposed iRBC than on the infected cells directly exposed to HBO up to 6 hours. Inhibition on parasite development was also observed after 4 hour-exposure; however no statistical difference was noticed ($P > 0.05$; by Mann-Whitney U test). To assess whether these iRBC, exposed or not to HBO, were still able to induce CM neurological signs, we collected 10⁶ iRBC exposed directly to HBO or left outside the hyperbaric chamber for 6 hours and injected them in susceptible mice. As shown in Figure 5B, mice infected with iRBC directly exposed to HBO or with those cells left outside the chamber did not present significant differences ($P > 0.05$, by Log-Rank test) when the survival curves were compared. Taken together, these data suggest that 6 hour-HBO-exposure does not directly affect PbA-infected erythrocytes nor alter their ability to induce CM clinical symptoms.

DISCUSSION

In the present study, we show that HBO therapy (100% O₂, 3.0 ATA) is capable of protecting PbA-infected mice against CM and delaying CM specific neurological signs. These observations demonstrate for the first time that pressurized oxygen therapy, at hyperbaric conditions well tolerated in humans and animals, can prevent CM clinical outcomes, including death.

In an experimental rat model of brain trauma, recent studies have shown that HBO has a neuroprotective effect against focal cerebral ischemia, especially when initiated

within the first 6 hours [28]. This occurs by reducing BBB damage, preventing apoptosis and does not increase lipid oxidation levels [29-32]. HBO neuroprotection was also observed in neonatal rats after induction of the ischemic process [33]. Rabbits exposed to pressurized oxygen for 90 min during 3 consecutive days presented a significant reduction in brain edema area and cerebral necrosis [34]. In addition, preservation of the BBB, reduction in HIF-1 α levels, decreased apoptosis and neuronal damage were observed in a rat model for subarachnoid hemorrhage after exposure to HBO [35]. In humans, exposure of thirty-seven brain-injured-patients to sixty-minutes HBO treatment every 24 hours increased cerebral metabolic oxygen rate and reduced cerebrospinal lactate levels [36]. In another study, 10 out of 22 patients with cerebral infarction presented amelioration of their motor function and 7 of those in their revascularization after pressurized oxygen sessions [37].

We also have shown that neuroprotective effects of daily hyperbaric sessions rely on the combination of hyperoxia and pressure at 3.0 ATA (Figure 3), as CM specific mortality of PbA-infected mice submitted to 100% oxygen pressurized at 1.0 ATA did not differ significantly from the non-exposed animals. In fact, in an experimental model for cerebral ischemia, HBO neuroprotection is not achieved in animals submitted to pure oxygen at only 1.0 ATA [29,30], and human stimulated monocyte-macrophages cultured in hyperoxia did not present changes in their cytokine expression levels [17]. More importantly, in a study with 12 CM comatose patients who breathed 95% oxygen, no improvement in the consciousness levels were observed in any of those individuals [7].

When we assessed the HBO effects on cerebral outcomes, we noticed a significant reduction in hypothermia and in the BBB breakdown in mice exposed to pressurized oxygen (Figure 4). This corroborates previous findings where HBO conditions (100% O₂, 2.8 - 3.0 ATA) prevent BBB permeability and functionality in animals submitted to a brain injury [30, 35].

Nevertheless, the precise mechanisms responsible for the HBO neuroprotective effects against CM are still unknown. Brain macrophage from adults and children who died of CM expressed higher levels of immunological markers that are normally not upregulated [9]; and higher levels of proinflammatory (Th1) cytokines such as, IFN- γ , IL-1 β and TNF- α [10-12], that in turn increase expression of ICAM-1 a host receptor also involved in *Plasmodium falciparum* cytoadhesion to the endothelium [10]. Furthermore, in experimental CM models, perforin⁺ CD8 T cells migrating to the brain have been shown to be responsible for CM mortality [38-39]. iRBC cytoadhesion to human endothelial cells induces apoptosis [40], implicating cytotoxicity and apoptosis in the BBB disruption and contributing to CM development. On the other hand, pressurized oxygen is able to inhibit synthesis of pro-inflammatory cytokines; the migration of immunocompetent cells, the expression of ICAM-1, the neuronal apoptosis and able to upregulate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is involved in angiogenesis in human endothelial cell [16,17,19,22,41] Based on these findings, we could speculate that some of these mechanisms could play a role in the HBO neuroprotective effects in a non-excluding manner. Experiments are currently under way to investigate the involvement of these mechanisms.

By comparing exposed animals with non-exposed animals we noticed a significant reduction on parasitemia levels of PbA-infected mice exposed to HBO (11-day-exposure protocol) during the first days of infection (4-6 p.i.; Figure 1B), and *P. c. chabaudi*-infected mice exposed to HBO in the same conditions did not present a significant reduction on the parasite burden, except on day 3 p.i.. However, in a recent study, daily sessions of 100% pressurized oxygen at 2.5 ATA significantly reduced the size of *Leishmania amazonensis* lesions and the parasite development in infected mice [27]. The reason for this discrepancy is still not clear. In our *in vitro* analyses, direct exposure to HBO for up to 6 hours was not harmful to normal or PbA-infected erythrocytes (data not shown and Figure 5), differing

from previous studies where direct exposure of *L. amazonensis* promastigotes to HBO for up to 6 hours significantly decreased parasite viability [25].

As it is assumed that HBO increases the levels of reactive oxygen intermediates (ROI) [42], we believe that the disparity of these two protozoan parasites in terms of HBO susceptibility might be linked to differential killing mediated by reactive oxygen intermediates (ROI). It has been shown that leishmania parasite killing is sensitive to ROI, whereas PbA-infected erythrocytes are resistant to killing by ROI, even at superphysiological doses, and ROI are not essential for controlling *P. c. chabaudi* parasitemia [43-45]. It seems that HBO may present a dual effect, as 90-minutes HBO exposure inhibits synthesis of IL-1 β and TNF- α by human monocytes-macrophages, whereas after 3 hours exposure, immunosuppression was no longer noticed, and after 12 hours increasing levels of IL-1 β were detected [17]. Therefore, the reduced levels of parasite burden in *L. amazonensis*-infected mice up to 70 days p.i., and the higher levels of TNF- α and IFN- γ 20 days p.i. observed by Arrais-Silva *et al.* may be related to the length of the exposure [27].

In summary, we have presented evidence of the beneficial effects induced by HBO therapy against ECM. We also demonstrated that administration of pressurized oxygen prevents BBB breakdown and severe mice hypothermia, without directly affecting iRBC viability and infectivity. Since complementary therapies such as steroids, sodium bicarbonate and heparin are deleterious in CM, and treatment with an anti-TNF- α monoclonal can worsen neurological signs [46]; the data presented here open promising perspectives to further investigate HBO neuroprotective mechanisms and to consider it as a new supportive therapy that could act alone or in association with conventional treatment or with recently discovered neuroprotective or anti-inflammatory molecules to improve poor CM outcomes [47-48].

REFERENCES

1. Carter JA, Ross AJ, Neville BG, Obiero E, Katana K, *et al.* (2005) Developmental impairments following severe falciparum malaria in children. *Trop. Med. Int. Health.* 10:3-10.
2. Newton CRJC, Krishna S (1998) Severe Falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther.* 79: 1-53.
3. Newton, CR, Peshu N, Kendall B, Kirkham FJ, Sowunmi A, *et al.* (1994) Brain swelling and ischaemia in Kenyans with cerebral malaria. *Arch. Dis. Child.* 70: 281-287.
4. Newton CR, Marsh K, Peshu N, Kirkham FJ (1996) Perturbations of cerebral hemodynamics in Kenyans with cerebral malaria. *Pediatr. Neurol.* 15: 41-49.8. Patankar TF, Karnad DR, Shetty PG, Desai AP, Prasad SR (2002) Adult cerebral malaria: prognostic importance of imaging findings and correlation with postmortem findings. *Radiology.* 224: 811-816.
5. Pongponratn E., Riganti M., Punpoowong B., Aikawa M.(1991) Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 168-175.
6. White NJ, Warrell DA, Looareesuwan S, Chanthavanich P, Phillips RE, *et al.* (1985) Pathophysiological and prognostic significance of cerebrospinal-fluid lactate in cerebral malaria. *Lancet.* 1: 776-778.
7. Warrell DA, White NJ, Veall N, Looareesuwan S, Chanthavanich P, *et al.* (1988) Cerebral anaerobic glycolysis and reduced cerebral oxygen transport in human cerebral malaria. *Lancet.* 2: 534-538.
9. Medana IM, Turner GD (2006) Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int. J. Parasitol.* 36: 555-568.
10. Hunt NH, Grau GE (2003) Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends. Immunol.* 24: 491-499.

11. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whitten RO, Mueller JS, et al. (2004) Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat. Med.* 10: 143-145.
12. Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave PA, Mishra GC, et al. (2006) Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *J. Infect. Dis.* 194: 198-207.
13. Gudewicz TM, Mader JT, Davis CP (1987) Combined effects of hyperbaric oxygen and antifungal agents on the growth of *Candida albicans*. *Aviat. Space. Environ. Med.* 58: 673-678.
14. Park MK, Myers RA, Marzella L (1992) Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin. Infect. Dis.* 14: 720-740.
15. Al-Waili NS, Butler GJ (2006) Effects of hyperbaric oxygen on inflammatory response to wound and trauma: possible mechanism of action. *The Scientific World Journal.* 6: 425-41.
16. Lahat N, Bitterman H, Yaniv N, Kinarty A, Bitterman N (1995) Exposure to hyperbaric oxygen induces tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) secretion from rat macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 102: 655-659.
17. Benson RM, Minter LM, Osborne BA, Granowitz EV (2003) Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 134: 57-62.
18. Yang ZJ, Bosco G, Montante A, Ou XI, Camporesi EM (2001) Hyperbaric O₂ reduces intestinal ischemia-reperfusion-induced TNF-alpha production and lung neutrophils sequestration. *Eur. J. Appl. Physiol.* 85: 96-103.
19. Buras JA, Stahl GL, Svoboda KK, Reenstra WR (2000) Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278: 292-302.

20. Yin W, Badr AE, Mychaskiw G, Zhang JH (2002) Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model. *Brain. Res.* 926: 165-171.
21. Li Y, Zhou C, Calvert JW, Colohan AR, Zhang JH (2005): Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model. *Exp. Neurol.* 191: 198-210.
22. Al-Waili N, Butler GJ, Beale J, Abdullah MS, Hamilton RWB, et al. (2005) Hyperbaric oxygen in treatment of patients with cerebral stroke, brain trauma, and neurological disease. *Adv. Therapy.* 22: 659-678.
23. Rencricca NJ, Coleman RM, Altschule MD, Faletra PP, Gray AD, et al. (1981) Quantification of hyperbaric oxygen-induced toxicity utilizing a malarial system. *Aviat. Space. Environ. Med.* 52: 85-87.
24. Engwerda C, Belnoue E, Gruner AC, Renia L (2005) Experimental models of cerebral malaria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 297: 103-143.
25. Arrais-Silva WW, Collhone MC, Ayres DC, de Souza Souto PC, Giorgio S (2005) Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Parasitol. Int.* 54: 1-7.
26. Piguet PF, Kan CD, Vesin C, Rochat A, Donati Y, et al. (2001) Role of CD40-CVD40L in mouse severe malaria. *Am. J. Pathol.* 159: 733-742.
27. Arrais-Silva W.W, Pinto E.F, Rossi-Bergmann B, Giorgio S (2006) Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissue lesions in mice. *Acta. Trop.* 98: 130-136.
28. Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, Brecht S, Deuschl G (2004) Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats. *Stroke.* 35: 578-83.

29. Veltkamp R, Siebing DA, Heiland S, Schoenfeldt-Varas P, Veltkamp C, *et al.* (2005a) Hyperbaric oxygen induces rapid protection against focal cerebral ischemia. *Brain. Res.* 1037: 134-138.
30. Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, Heiland S, Bieber K, *et al.* (2005b) Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 36: 1679-1683.
31. Schabitz Wr, Schade H, Heiland S, Kollmar R, Bardutzky J, *et al.* (2004) Neuroprotection by hyperbaric oxygenation after experimental focal cerebral ischemia monitored by MRI. *Stroke.* 35: 1175-1179.
32. Yin D, Zhou C, Kusaka I, Calvert JW, Parent AD, *et al.* (2003) Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 23: 855-64.
33. Calvert JW, Yin W, Patel M, Badr A, Mychaskiw G, *et al.* (2002) Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. *Brain. Res.* 951: 1-8
34. Niklas A, Brock D, Schober R, Schulz A, Schneider D (2004): Continuous measurements of cerebral tissue oxygen pressure during hyperbaric oxygenation-HBO effects on brain edema and necrosis after severe brain trauma in rabbits. *J. Neurol. Sci.* 219: 77-82.
35. Ostrowski RP; Colohan ART; Zhang JH (2005) Mechanisms of therapeutic of oxygen-induces neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 25: 554-571.
36. Rockswold SB, Rockswold GL, Vargo JM, Erickson CA, Sutton RL, *et al.* (2001) Effects of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients. *J. Neurosurg.* 94: 403-411.

37. Kapp JP (1981) Neurological response to hyperbaric oxygen- a criterion for cerebral revascularization. *Surg. Neurol.* 15: 43-46.
38. Pino P, Taoufiq Z, Nitcheu J, Vouldoukis I, Mazier D (2005) Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb. Haemost.* 94: 336-340.
39. Renia L, Potter S.M, Mauduit M, Rosa DS, Kayibanda M, et al.(2006) Pathogenic T Cells In Cerebral Malaria. *Int. J. Parasitol.* 36: 547-554.
40. Pino P, Vouldoukis I, Kolb JP, Mahmoudi N, Desportes-Livage I, et al. (2003) *Plasmodium falciparum*--infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 187: 1283-90.
41. Lee CC, Chen SC, Tsai SC, Wang BW, Liu YC, et al. (2006) Hyperbaric oxygen induces VEGF expression through ERK, JNK and c-Jun/AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biomed. Sci.* 13: 143-156.
42. Hink J, Jansen E (2001) Are superoxide and/or hydrogen peroxide responsible for some of the beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy? *Med. Hypotheses.* 57: 764-769.
43. Reiner SL, Zheng S, Wang ZE, Stowring L, Locksley RM (1994) *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J. Exp. Med.* 179: 447-456.
44. Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos JA, Intaglietta M, van der Heyde H (2005) *Plasmodium berghei* resists killing by reactive oxygen species. *Infect. Immun.* 73:6704-6710.
45. Gillman BM, Batchelder J, Flaherty P, Weidanz WP (2004) Suppression of *Plasmodium chabaudi* parasitemia is independent of the action of reactive oxygen intermediates and/or nitric oxide. *Infect. Immun.* 72: 6359-6366.
46. Idro R, Jenkins NE, Newton CRJ (2005) Pathogenesis, clinical features, and neurological outcomes of cerebral malaria. *The Lancet.* 4: 827-840.

47. Kaiser K, Texier A, Ferrandiz J, Buguet A, Meiller A, *et al.* (2006) Recombinant human erythropoietin prevents the death of mice during cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* 193: 987-995.
48. Wassmer SC, Cianciolo GJ, Combes V, Grau GE (2005) Inhibition of endothelial activation: a new way to treat cerebral malaria? *PloS. Med.* 2: 245e.

Acknowledgments

Many thanks to Dr. Lindsay Ann Pirrit for revising the English.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant n° 2004/00638-6 and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Y.C.B., W.W.A. and S.C.P.L. were supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Author's Contributions

YCB performed all animal experiments and helped draft the manuscript and interpret the data.

SCPL performed the *in vitro* assays and helped draft the manuscript.

WWA set up the HBO conditions and contributed to the interpretation of the data.

BOC was the first to show the effect of HBO in *Plasmodium* infected mice and helped to draft the manuscript.

RA helped in imaging analysis, interpretation the data and manuscript revising.

SG participated in the design of the study, helped to draft and revise the manuscript.

FTMC conceived the study, contributed to its design and coordination and helped interpret the data, and draft the manuscript.

All authors read and approved the final version of the manuscript.

Figure Legends

Figure 1. Survival curve and parasitemia levels of *P. berghei* ANKA-infected mice exposed, or not, to HBO. (A) Groups of 10 mice infected i.p. with 10^6 iRBC were daily exposed, or not, to HBO (100% O₂, 3.0 ATA) conditions during 1 h from day 0 to 10. Pressurized oxygen significantly protects mice against CM neurological symptoms ($P = 0.0004$; by Log-Rank test). Neurological signs of CM appeared on days 5-10 with death occurring approximately 24h after onset (shaded area). (B) Parasitemia levels were assessed daily in those mice exposed, or not. HBO significantly reduced parasite burden on days 4, 5 and 6 (respectively, $P = 0.01$; 0.02 and 0.02; by Mann-Whitney U test), when compared to control mice. No statistical difference was observed on the other days of infection.

Figure 2. Evaluation of HBO neuroprotective effect after parasite establishment. Twenty mice were injected i.p. with 10^6 iRBC; on day 4 p.i. (parasitemia of 4%) 10 animals, randomly selected, were daily exposed to HBO therapy (100% O₂, 3.0 ATA) during 2 hours from day 4-7 after parasite inoculation. Survival curves of both groups demonstrated that HBO significantly delayed mice mortality ($P = 0.003$; by Log-Rank test).

Figure 3. Role of the pressure on HBO neuroprotection effect. Groups of 10 PbA-infected mice were daily exposed, or not, to HBO conditions (100% O₂, 1 hour per day) at 1.0 ATA, until all the animals died. Survival curves of the one hundred percent normobaric oxygen exposed mice and animals exposed to normal air did not differ significantly ($P > 0.05$; by Log-Rank test).

Figure 4. Determination of the brain-blood-barrier integrity. Six PbA-infected mice, representative of each group (n = 8), exposed, or not, to HBO treatment (100% O₂, 3.0 ATA, 1 hour per day) were injected i.v. with 1% Blue Evans solution early on day 7 post-infection. **(A)** One hour after Blue Evans injection, brains of naïve animals or PbA-infected mice HBO treated, or not, were collected and photographed (n = 4 of each group). **(B)** The BBB dysfunction of naïve mice or PbA-infected animals submitted, or not, to hyperbaric conditions, was determined by brain staining quantification, with the aid of the ImageJ™ software (n = 4 of each group). HBO significantly reduces ($P = 0.0039$; by Mann-Whitney U test) infected-mice brain staining in comparison to non-treated animals. No statistical difference was noticed between naïve and HBO treated infected mice ($P > 0.05$; by Mann-Whitney U test); and brains collected from non-treated infected mice were significantly ($P = 0.0039$; by Mann-Whitney U test) darker than naïve animals. Results are expressed as the mean of brightness intensity of each delimited brain area of six mice \pm standard deviation.

Figure 5. Direct effect of HBO therapy on iRBC of *P. berghei* ANKA. 10⁶ iRBC /mL of PbA in a 24-well-plate were directly exposed, or not, to HBO conditions (100% O₂, 3 ATA). **(A)** Parasitemia levels were evaluated at four or six hours after direct iRBC exposure to pressurized oxygen conditions. Parasite burden decreases significantly after 4 or 6 ($P < 0.05$; by Mann-Whitney U test) hours in comparison to 0 hour. Reduction on parasitemia levels were more pronounced on infected cells left in normal room air than iRBC submitted to HBO directly; after 4 ($P > 0.05$; by Mann-Whitney U test) or 6 hour-exposure ($P = 0.01$; by Mann-Whitney U test). Results are expressed as the mean of quadruplicates \pm standard deviation. **(B)** Mice (n=8 each group) were infected with 10⁶ iRBC of PbA collected after six hours of direct exposure, or not, to HBO. No statistical difference was noticed when survival curves were compared ($P > 0.05$; by Log-Rank test).

Figure 1

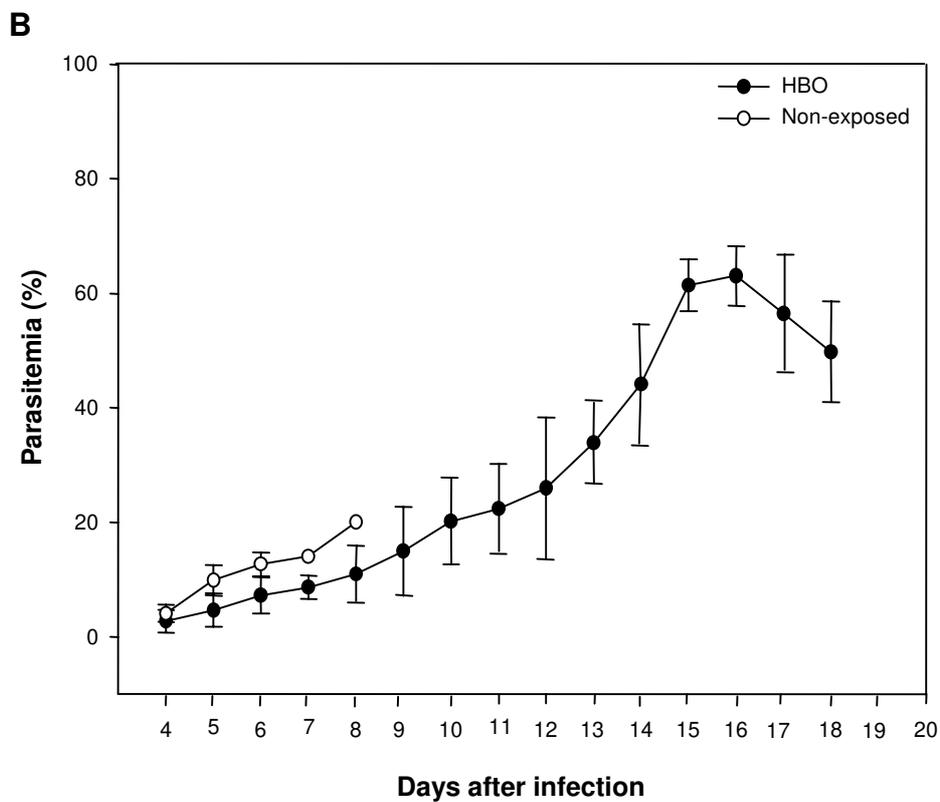
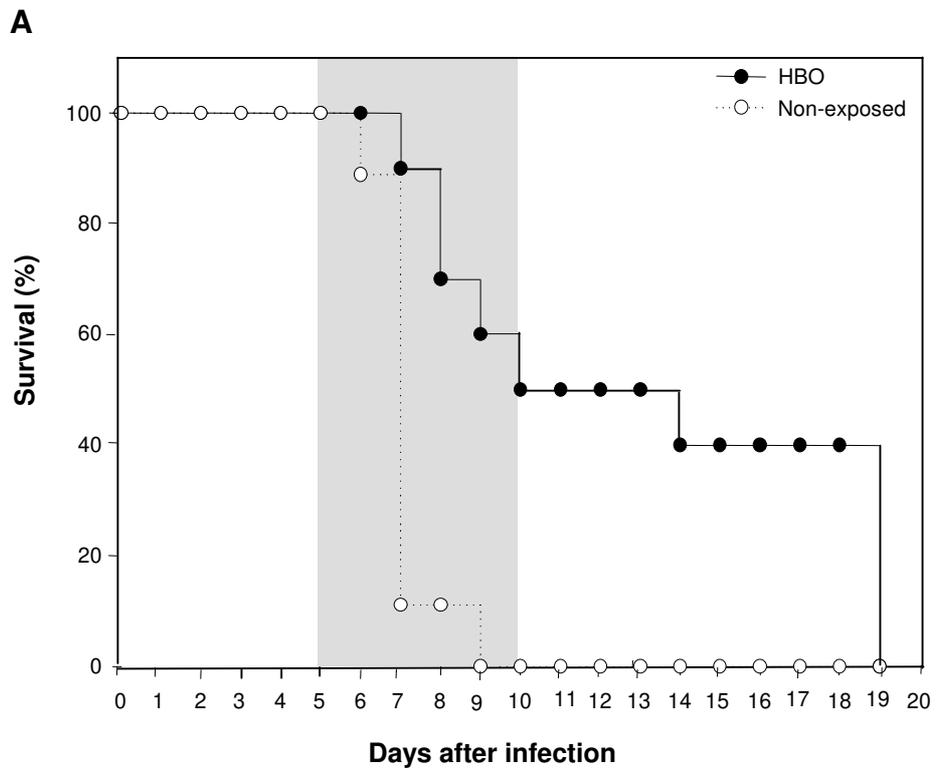


Figure 2

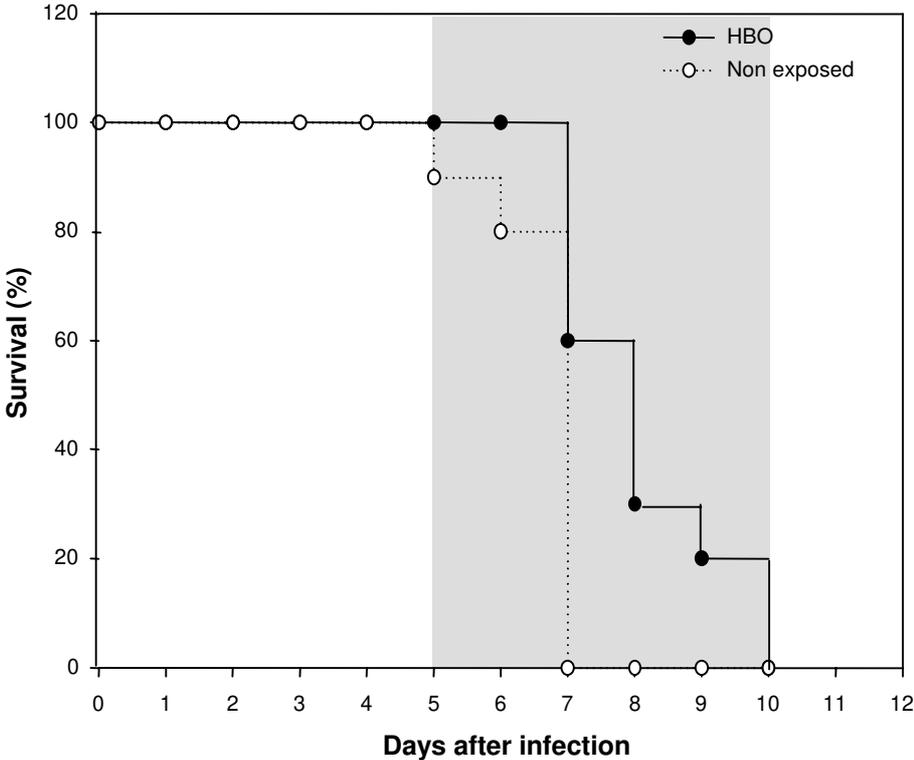


Figure 3

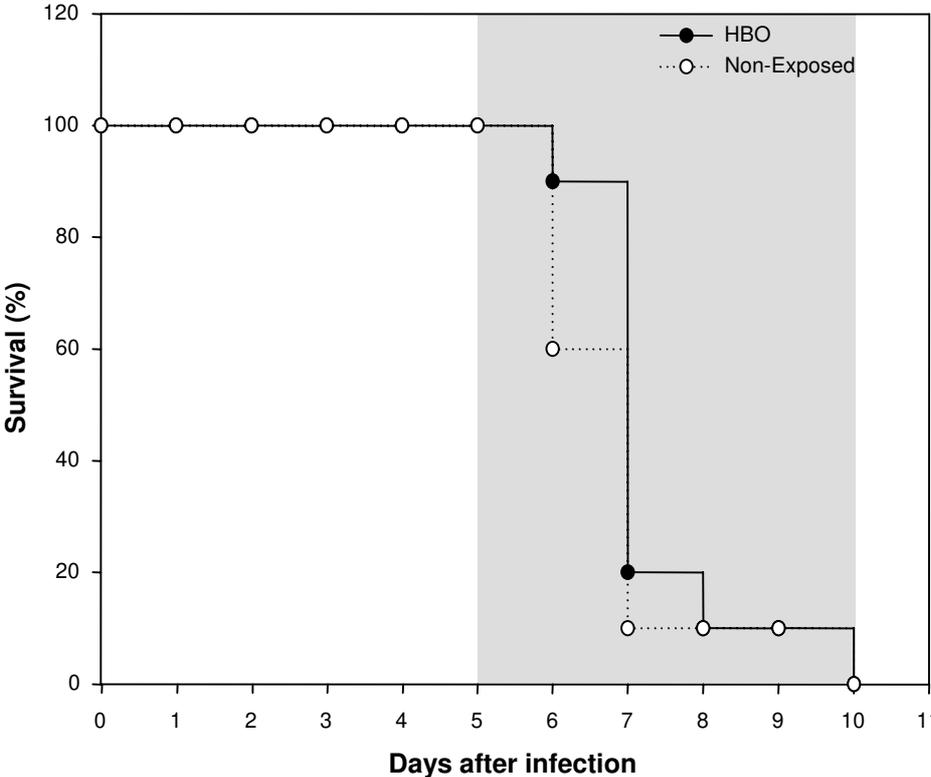


Figure 4

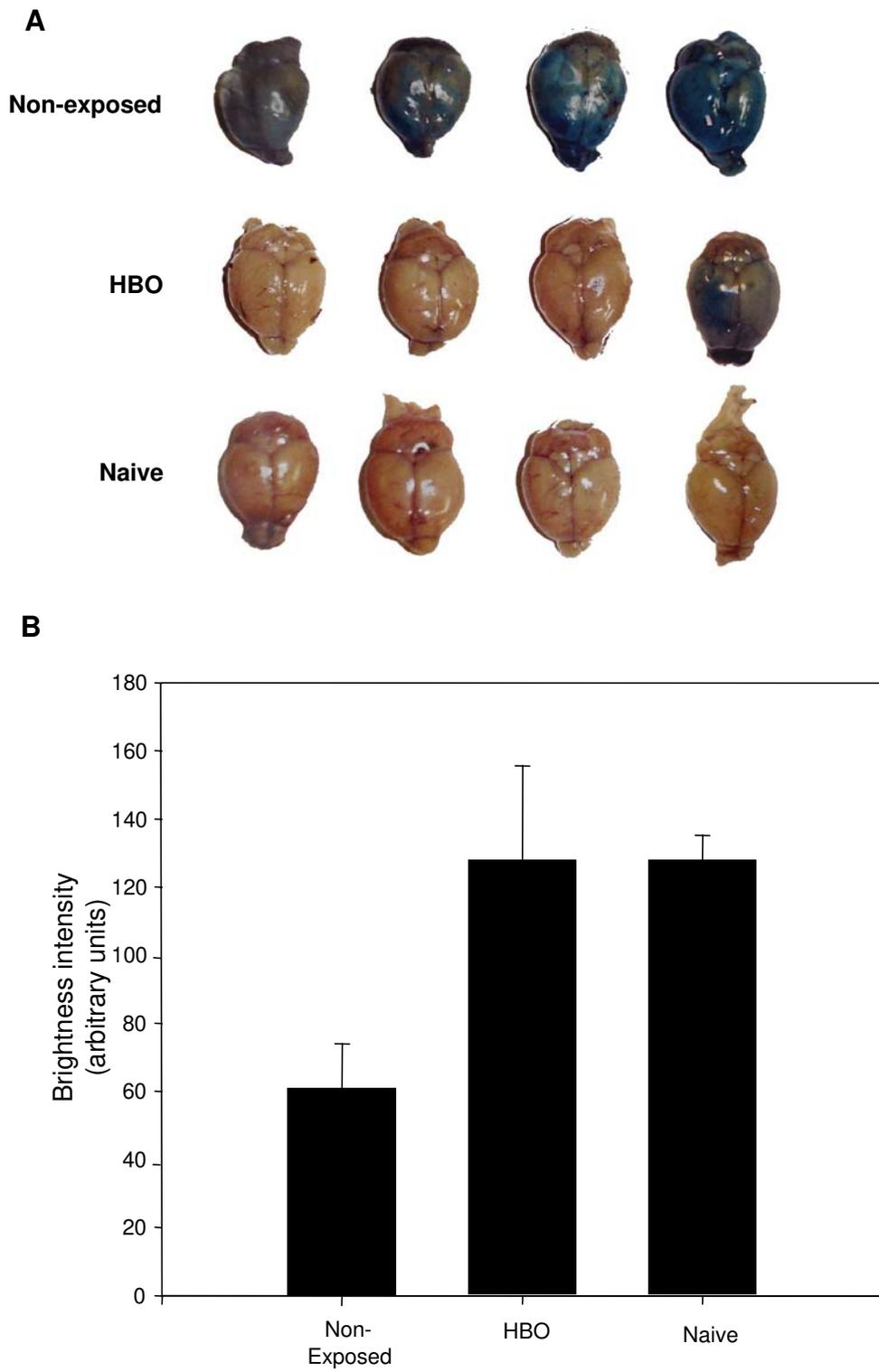


Figure 5

