



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR
LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA EXPERIMENTAL

**O TRATAMENTO COM GLUTATIONA POTENCIALIZA O DANO
HEPÁTICO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
Plasmodium berghei (ANKA).**

NAYARA KAUFFMANN

BELÉM/PA

2016

NAYARA KAUFFMANN

**O TRATAMENTO COM GLUTATIONA POTENCIALIZA O DANO
HEPÁTICO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM**

Plasmodium berghei (ANKA).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do título de mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira.

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano

BELÉM/PA

2016

L433c Kauffmann, Nayara.

O tratamento com Glutathione potencializa o dano hepático em camundongos infectados com *Plasmodium Berghei* ANKA / Nayara Kauffmann – Belém/PA, 2016.

117 fls.: il. color.

Dissertação de mestrado – Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia Celular. Linha de Pesquisa: Fisiologia.

Orientadora: Prof. Dr^a Karen Renata Matos Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária:

Andrea da Silva Reis: CRB – 11/436

NAYARA KAUFFMANN

**O TRATAMENTO COM GLUTATIONA POTENCIALIZA O DANO
HEPÁTICO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
Plasmodium berghei (ANKA).**

Orientadora: Prof. Dr^a. Karen
Renata Herculano Matos Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson
Manoel Herculano

Dissertação de Mestrado aprovada em 10 de maio de 2016.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Adelaide da Conceição Fonseca Passos
Centro Universitário do Pará - CESUPA

Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA

BELÉM/PA
2016

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação da Prof.^a. Dr^a. Karen Renata Herculano Matos Oliveira. A realização da pesquisa contou com o apoio das seguintes instituições de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (Fapespa)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a pessoa mais importante da minha vida, minha mãe Glória. Que contribuiu para minha formação e confiou no meu potencial. Esteve presente em todos os momentos, bons ou ruins, nesta fase da minha vida. Agradeço por todo o amor, carinho, compreensão e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a felicidade dessa conquista, me dando saúde e força para batalhar a cada dia.

Agradeço a minha mãe, Glória Kauffmann, pelo apoio, incentivo e pelo exemplo de mulher guerreira, determinada e otimista.

Agradeço a minha família que sempre esteve presente na vida, me dando apoio em especial as minhas primas Lidianny e Angélica por todas as conversas e incentivo.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Prof.^a Dr^a. Karen Oliveira por ter me permitido conhecer o mundo da ciência e poder ver como este mundo é maravilhoso, obrigada pelo exemplo de profissional, cada ensinamento, cobrança e apoio foram fundamentais em minha formação.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Anderson Herculano por ter aberto as portas do laboratório (LNE), e permitido que este trabalho fosse realizado, agradeço por todos os ensinamentos, contribuições e discussões sobre o meu trabalho, foi de extrema importância para a minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Evander Batista por toda contribuição dada ao meu trabalho, o senhor foi de extrema importância para que esse trabalho fosse realizado.

Aos professores, Dr. José Luiz Fernandes Vieira, Dra. Adelaide da Conceição Fonseca Passos e Dr. Fernando Allan de Farias Rocha, por todos as críticas e contribuições realizadas desde o plano até a defesa da minha dissertação de mestrado. Todas foram muito valiosas.

As minhas amigas da malária, karinérgicas ou renatetes, Lizandra Souto, Brenda Ataíde e Carolina Vasconcelos, vocês são as melhores companheiras de laboratório que alguém poderia ter, agradeço a vocês por todas as contribuições,

e discussões a respeito do meu trabalho, obrigado por estarem presentes nessa etapa da minha vida.

Não poderia deixar de agradecer a Danielle Braga por ter me ajudado na realização dos meus experimentos.

Agradeço a Dona Fátima pelo apoio e incentivo. Aos colegas do LNE: Lucas Luz, Martha Sousa, Tatiana Alves, Diego Rodrigues, Analú Maciel, Nadyme Assad que diretamente ou indiretamente me apoiaram ao longo dessa caminhada e que hoje compartilham comigo esta alegria.

Às pessoas que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, Carlos e Amarildo.

A FAPESPA, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular.

Muito obrigada a todos!

Ter certeza é melhor que imaginar, acordar é melhor que dormir e mesmo o pior fracasso, mesmo o pior e incontornável erro é melhor do que nunca tentar.

Shonda Rhimes.

RESUMO

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e apresenta-se como um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Para avaliar o quadro de malária, modelos murinos tem sido utilizado devido às suas similaridades entre as espécies infectantes para os camundongos e as espécies infectantes para o homem. O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e alterações na atividade de enzimas como a glutatona peroxidase e superóxido dismutase foram caracterizadas dentro do quadro clínico da doença, porém pouco se sabe a respeito da participação de moléculas antioxidantes como a glutatona na evolução da doença. Diante do exposto, o principal objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da glutatona na evolução do quadro de malária murina e frente aos danos causados pela infecção com cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Para isso foram utilizados camundongos Balb-C, o qual foi inoculado ($\sim 10^6$ de eritrócitos parasitados) via intraperitoneal. Os grupos foram divididos em: grupo malária (PbA) (n=6), grupo PbA + GSH 1mg (n=6), grupo PbA +GSH 3mg (n=6) e grupo PbA +GSH 8mg (n=7), tratados por 7 dias consecutivos. O desenvolvimento da doença foi monitorado diariamente pela determinação da sobrevivência, massa corpórea e a parasitemia foi monitorada a cada três dias em distensões sanguíneas, também foi analisado os cortes histológicos do tecido hepáticos e foi realizado a dosagem bioquímica das transaminases hepáticas. Nossos dados demonstraram que o tratamento com GSH (8mg/kg) acelerou a mortalidade dos animais infectados uma vez que entre o 13-14 dia pós infecção cerca de 43% dos animais evoluíram a óbito. No grupo infectado com PbA que não recebeu tratamento com GSH, uma diminuição semelhante (40%) só foi observada a partir do 23-25 dia pós infecção. Já em relação aos grupos PbA+GSH 1mg e PbA+GSH 3mg, não houve diferença quando comparado com o grupo PbA. Interessantemente, embora o tratamento com GSH 8mg tenha acelerado a mortalidade no grupo infectado, não observamos diferença significativa no nível de parasitemia dos quatros grupos analisados. Em relação a massa corpórea foi possível observar uma diferença entre o dia 0 e 24 em todos os grupos, porém quando analisado entre os grupos. Já no que diz respeito as análises histológicas e dosagens bioquímicas, podemos observar que ouve alterações tanto na histologia quanto na nas transaminases, sendo estas alterações mais expressas no grupo PbA que foi tratado com glutatona 8mg/kg do que no grupo PbA. Concluindo que a glutatona quando administrada via intraperitoneal acelera a mortalidade dos camundongos infectados com a cepa ANKA, porém essa mortalidade não está associada com aumento da parasitemia, indicando então que a mortalidade pode ser decorrente das alterações hepáticas.

Palavra-Chave: Malária, *Plasmodium berghei* ANKA, fígado, Glutatona.

ABSTRACT

Malaria is a disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and presents itself as a major public health problems in the world. To evaluate the malaria frame, murine models have been used for its similarities between species infective for mice and species infective to man. The increased production of reactive oxygen species and changes in the activity of enzymes such as glutathione peroxidase and superoxide dismutase have been characterized within the clinical picture of the disease, but little is known about the participation of antioxidant molecules such as glutathione in the evolution of the disease. Given the above, the main objective of this study is to evaluate the effect of glutathione in the evolution of murine malaria frame and front to damage caused by infection with *Plasmodium berghei* ANKA strain (PbA). To this were Balb-C mice, which were inoculated ($\sim 10^6$ parasitized erythrocytes) intraperitoneally. The groups were divided into malaria group (PbA), PbA group + GSH 1 mg, PbA group + GSH 3 mg and PbA group + GSH 8 mg treated for 7 days consecutive. The development of the disease was monitored daily by determining the survival, body mass and parasitaemia was monitored every three days in blood strains, was also analyzed the histological sections of liver tissue was performed and the biochemical analysis of liver transaminases. Our data demonstrated that treatment with GSH (8mg/kg) accelerated mortality of infected animals once between days 13-14 after infection about 43% of the animals progressed to death. In the group infected with PbA that received no treatment with GSH, a similar reduction (40%) was observed only from 23-25 days post infection. In relation to PbA + GSH 1mg groups and GSH + PbA 3 mg, there was no difference when compared to the PbA group. Interestingly, although treatment with GSH 8mg has accelerated mortality in the infected group, no significant difference in parasitaemia level of the four groups analyzed. In relation to body mass was observed a difference between day 0 and 24 in all groups, but when analyzed between groups. In what concerns the histological and biochemical tests, we noted that listen both changes in histology and in transaminase, with the latter being expressed in PbA changes group was treated with glutathione 8mg / kg group than in PbA. Concluding that glutathione when administered intraperitoneally accelerates the mortality of mice infected with the ANKA strain, but this mortality is not associated with increased parasitemia, then indicating that mortality may result from liver changes.

Keyword: Malaria, *Plasmodium berghei* ANKA, liver, glutathione

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de risco mostrando o percentual da população geográfica mundial susceptível a contrair malária. Mapa da prevalência e distribuição geográfica de casos clínicos da malária no Brasil. Fonte: SINAN/SVS/MS e SIVEP-Malária/SVS/MS, 2015 Fonte: WHO, 2015.....	21
Figura 2	Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no homem (A). Passagem dos merozoítos na corrente sanguínea e ação dos esporozoítos no fígado (B) adaptado de (COWMAN & KAPPE, 2006.....	25
Figura 3	Anatomia do fígado e seus componentes celulares. Adaptado de Crossingham et al., 2009.....	30
Figura 4	Síntese Glutaciona. A síntese da GSH ocorre em duas etapas: catalisada pela γ -glutamil-cisteína-sintetase e pela glutaciona-sintetase. Fonte: Shelly, 2013.....	35
Figura 5	Avaliação do ganho de massa corpórea de camundongos Balb-C infectados com a cepa PbA tratados com GSH ou PBS. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Malária, PbA+GSH 1mg/Kg; PbA+GSH 3 mg/Kg e PbA+GSH 8 mg/Kg (n = 7 animais). Dados apresentados em Média \pm Erro Padrão; $p < 0.05$	47
Figura 6	Avaliação do curso temporal da malária em camundongos Balb-C infectados com a cepa PbA co-tratados com GSH ou PBS. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Malária (n=6), PbA+GSH 1mg/Kg; PbA+GSH 3 mg/Kg e PbA+GSH 8 mg/Kg (n = 7).....	49
Figura 7	Foto micrografias de distensões sanguíneas coradas com Giemsa (1000x) dos grupos infectados no 3 ^o , 6 ^o , 12 ^o e 15 ^o d.p.i. As setas marcam a presença dos diferentes estágios eritrocíticos do protozoário.....	51
Figura 8	Evolução da parasitemia de camundongos Balb-c infectados com a cepa PbA co-tratados com GSH ou PBS. Os animais foram	

inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Malária (n= 6 animais), PbA+GSH 1mg/Kg; PbA+GSH 3 mg/Kg e PbA+GSH 8 mg/Kg (n= 7 animais)

52

Figura 9 As alterações histopatológicas do fígado do grupo controle (A), grupo glutathione 8 mg/kg (B), grupo malária cepa PbA (C) e grupo malária tratado com glutathione 8 mg/kg (D) Imagens de A-D são mostradas em 200x de ampliação; imagens E F são mostradas em 400x; barras são de 50 μ m. H- Hepatócitos H, V- veia hepática, S- área sinusoidal, Asterisco*- Esteatose, Cerquilha # - Células inflamatórias, Seta- Células de Kupffer com pigmento malárico (hemozoína).

55

Figura 10 Concentração dos níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) no plasma de camundongos Balb-C no 10^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Controle (sem infecção); Glutathione 8mg (sem infecção); PbA e PbA+Glutathione 8 mg/Kg. * $p < 0,001$ vs controle; # $p < 0,05$ vs PbA; ** $p < 0,001$ vs glutathione 8mg. Dados apresentados em Média \pm Erro Padrão.

58

Figura 11 Concentração dos níveis de Alanina Aminotransferase (ALT) no plasma de camundongos Balb-C no 10^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Controle (sem infecção); Glutathione 8mg (sem infecção); PbA (infectado) e PbA+Glutathione 8 mg/Kg. * $p < 0,001$ vs controle; # $p < 0,05$ vs PbA. Dados apresentados em Média \pm Erro Padrão.

59

Figura 12 Concentração dos níveis de Bilirrubina Total no plasma de camundongos Balb-C no 10^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Controle (sem infecção); Glutathione 8mg (sem infecção); PbA e PbA+Glutathione 8 mg/Kg. Dados apresentados em Média \pm Erro Padrão; $p < 0,05$.

61

Figura 13 Concentração dos níveis de Bilirrubina Direta no plasma de camundongos Balb-C no 10^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10⁶ de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Controle (sem infecção); Glutathione 8mg (sem infecção); PbA e PbA+Glutathione 8 mg/Kg. Dados apresentados em Média±Erro Padrão; p<0.01..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Organização dos grupos experimentais de acordo com os tratamentos. * <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA). Glutathione (GSH) ...	40
Tabela 2	Esquema de classificação das Alterações histopatológicas avaliadas no tecido hepático. Adaptado de Viriyavejakul et al., 2014.....	44
Figura 3	Gradação Histológica do tecido hepático de camundongos infectados com a cepa ANKA de <i>Plasmodium berghei</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Aminoácidos

AST: Aspartato aminotransferase

ALT: Alanina aminotransferase

CAT: Catalase

CSP: Proteína circunsporozoíto

EROs: Espécies reativas de oxigênio

EDTA: Ácido diaminotetrácetico

GSH: Glutationa

GSSG: Glutationa Oxidada

GPX: Glutationa peroxidase

GR: Glutationa redutase

GGT: Gama Glutamil transpeptidase

HE: Hematoxilina Eosina

Hz: Hemozoína

I.P.: Intraperitoneal

INF- γ : Interferon γ

PbA: Cepa ANKA de *Plasmodium Berghei*

PBS: Solução salina com tampão fosfato

MC: Malária Cerebral

NO: óxido Nítrico

OH: Radical Hidroxila

TRAP: Proteína de adesão relacionada a trombospalina

SOD: Superóxido desmutase

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	19
1.2	TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO.....	22
1.2.1	O Ciclo Biológico.....	22
1.3	ASPECTOS CLÍNICOS DA MALÁRIA.....	26
1.4	FISIOLOGIA HEPÁTICA E MALÁRIA.....	27
1.5	MODELO EXPERIMENTAL.....	31
1.6	SISTEMA ANTIOXIDANTE E MALÁRIA	32
1.6.1	Glutathiona.....	34
2	OBJETIVO.....	37
2.1	OBJETIVO GERAL.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	39
3.2	INDUÇÃO DO QUADRO DE MALÁRIA.....	39
3.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO COM GLUTATIONA.....	40
3.4	AVALIAÇÃO DO QUADRO DE MALÁRIA.....	41
3.5	ANÁLISE HISTOLÓGICAS.....	42
3.5.1	Cortes histológicos.....	42
3.5.2	Coloração com hematoxilina e eosina.....	43
3.6	ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	44
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4	RESULTADOS.....	46
4.1	PADRONIZAÇÃO E EFEITO DA GLUTATIONA SOBRE O QUADRO DE MALÁRIA.....	46
4.1.1	Curva de sobrevivência, Parasitemia e Variação no ganho de massa corpórea.....	46
4.2	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PELA COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA.....	53
4.3	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS NO PLASMA DE CAMUNDONGOS	57

5	DISCUSSÃO.....	63
6	CONCLUSÃO.....	68
7	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é uma doença infecciosa de caráter agudo ou crônico, causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida ao homem pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Sua descoberta remota desde a antiguidade, no qual os primeiros relatos da doença foram descritos em textos religiosos e por médicos que relacionavam os repetidos episódios febris como punição divina (COX, 2010). Hipócrates no século V a.C foi o primeiro a descartar tais suposições, descrevendo o quadro clínico associado à malária (COX, 2010; SCHLAGENHAUF, 2004).

Já no século XVIII a doença foi descrita com o termo “*mal’aria*” ou ar contaminado, pois se acreditava que era proveniente de regiões pantanosas. Em meados de 1880 o médico francês Charles Alphonse Laveran descreveu os primeiros parasitas da malária em hemácias humanas, sendo então caracterizado seu modo de transmissão, bem como a elucidação do ciclo biológico do parasito (SUH; KAIN; KEYSTONE, 2004).

Por muito tempo a taxa de mortalidade associada a doença foi maior do que qualquer outra doença infecciosa, porém atualmente a malária ainda é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo. Na África e em alguns outros países subdesenvolvidos a mortalidade ainda permanece elevada, pois o acesso ao tratamento ainda é limitado (TUTEJA, 2007).

Atualmente a malária atinge cerca de 97 países, sendo endêmica nas regiões tropicais e subtropicais da África, Sudeste Asiático e América Latina. Estima-se que cerca de 3,2 bilhões de pessoas correm risco de contrair a doença (Figura 1 A) (WHO, 2016).

No Brasil, cerca de 99% dos casos são observados na região Amazônica, incluindo os Estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, que apresentam uma incidência anual de 400-700 mil casos (Figura 1 B). Além disso, o grande fluxo migratório da região Amazônica para outros estados brasileiros tem levado ao surgimento de surtos de malária em áreas consideradas livres de transmissão da doença (OMS, 2014).

De acordo com o Relatório Mundial da Saúde (2015), vem ocorrendo uma redução significativa nas taxas de mortalidade cerca de 30% a 47% desde o ano 2000, contudo, a doença ainda representa um importante problema de saúde pública, o que justifica os estudos voltados para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na patogênese da doença.

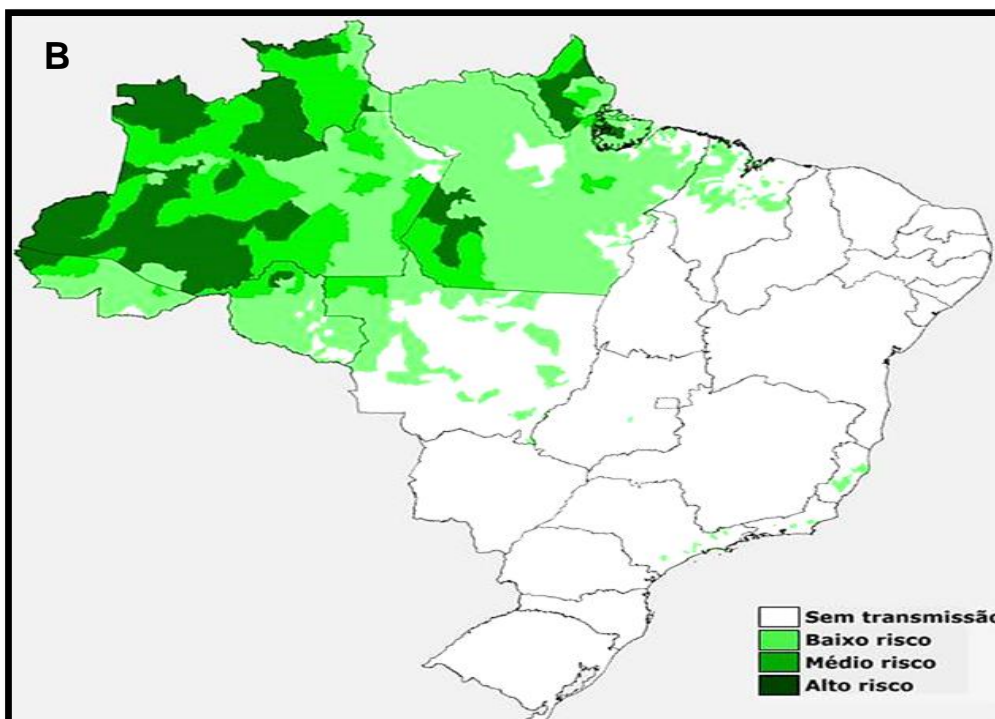
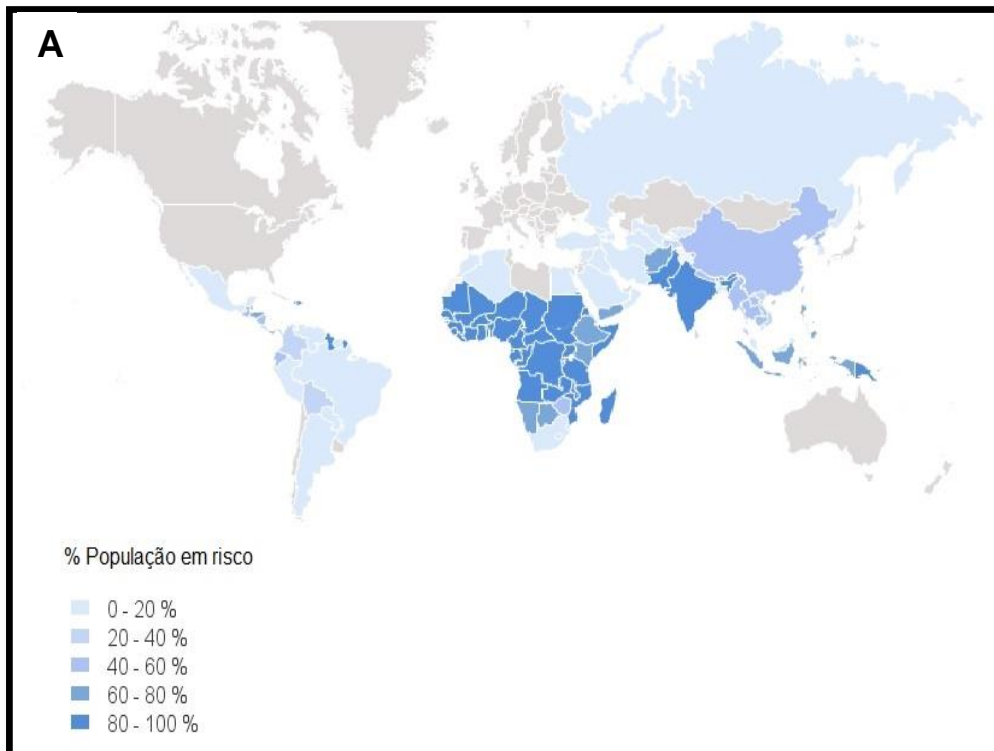


Figura 1: Mapa de risco mostrando o percentual da população geográfica mundial susceptível a contrair malária (A). Mapa da prevalência e distribuição geográfica de casos clínicos da malária no Brasil (B). Fonte: WHO, 2015; SINAN/SVS/MS e SIVEP-Malária/SVS/MS, 2015.

1.2 TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO

A malária é causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodidae e gênero *Plasmodium*. Seu principal modo de transmissão se dá através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, porém, outras formas de transmissão incluem a transfusão sanguínea, uso compartilhado de agulhas contaminadas ou congenitamente (OMS, 2014).

A literatura reporta que mais de 100 espécies de *Plasmodium* são capazes de infectar várias espécies de animais, como répteis, aves e alguns mamíferos, porém apenas cinco espécies de parasita podem infectar os seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium knowlesi* (NG et al., 2008; MULLER, 2015). Estas cinco espécies diferem em sua morfologia, aspectos imunológicos, distribuição geográfica, padrões de infecção e nas respostas ao tratamento (MULLER, 2015).

O *Plasmodium falciparum* é o agente da malária considerado mais grave, pois é potencialmente fatal, sendo a principal causa de morte pela malária em crianças na África (COX-SINGH et al., 2008).

1.2.1 O ciclo Biológico

O ciclo biológico do *Plasmodium* é complexo, podendo ser dividido em duas fases: assexuada no hospedeiro vertebrado e sexuada no hospedeiro invertebrado (FIGURA 2 A). O ciclo se inicia com a picada do mosquito fêmea e a entrada de esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (VANDERBERG & FREVERT, 2004). Em seguida, os esporozoítos chegam ao

fígado, atingindo especificamente as células hepáticas (hepatócitos), dando início a fase assexuada ou fase pré-eritrocítica da doença (Figura 2 B) (TAVARES et al., 2013).

Nesta fase os esporozoítos permanecem retidos no fígado, atravessando o epitélio sinusoidal, sendo este composto pelas células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado). Inicialmente acreditava-se que esse sequestro ocorreria por meio da ligação dos esporozoítos via proteína circunsporozoíto (CSP) e pela proteína de adesão relacionada com a trombosporina (TRAP), pelo qual iria se ligar aos proteoglicanos de sulfato de heparan, porém alguns estudos sugerem que estes esporozoítos sejam sequestrados por meio da interação da proteína CSP com proteoglicanos da matriz extracelular secretados pelas células de Ito, proteoglicanos sulfato de heparan e condroitina (FREVERT et al., 2005; BERTOLINO & BOWEN 2015).

Após o sequestro, os esporozoítos irão migrar pela camada de células endoteliais do sinusóide até as células de Kupffer, os quais expressam proteoglicanos na sua superfície, podendo assim serem reconhecidas pelo parasita. Uma vez no parênquima hepático, os esporozoítos irão atravessar os hepatócitos, rompendo assim a membrana celular (PRADEL & FREVERT, 2001).

Nos hepatócitos, os esporozoítos permanecerão por cerca de 2-16 dias, e irão se proliferar dando origem aos merozoítos. Durante esta fase, a infecção é assintomática, sendo que cada esporozoíto é capaz de produzir cerca de 30.000 merozoítos. A seguir, os hepatócitos se rompem liberando os merozoítos na corrente sanguínea, que irão invadir os eritrócitos iniciando então a fase eritrocítica do ciclo. Dentro dos eritrócitos, os merozoítos passam por três

estágios que são: anel, trofozoíto e esquizonte, sendo que cada esquizonte é capaz de conter cerca de 20 merozoítos que serão liberados na corrente sanguínea após a ruptura dos eritrócitos infectados. Alguns merozoítos, por um mecanismo desconhecido, se diferenciam em gametócitos (machos e fêmeas) que quando ingeridos pelo mosquito *Anopheles* sofrem maturação em seu estômago e se fundem, formando o zigoto. Este se transforma em oocineto, que migra para a parede do intestino do inseto formando o oocisto. O oocisto evolui a esporozoítos, que são liberados na hemolinfa e migram para as glândulas salivares dos insetos. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano proporciona a continuidade do ciclo de vida do *Plasmodium* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; GARCIA, 2010; SADANAND, 2010).

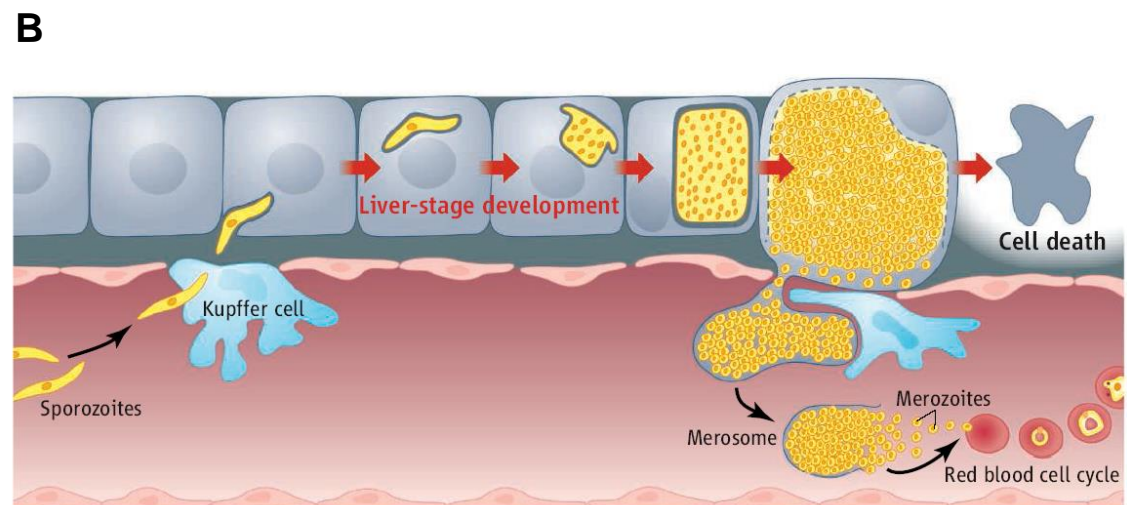
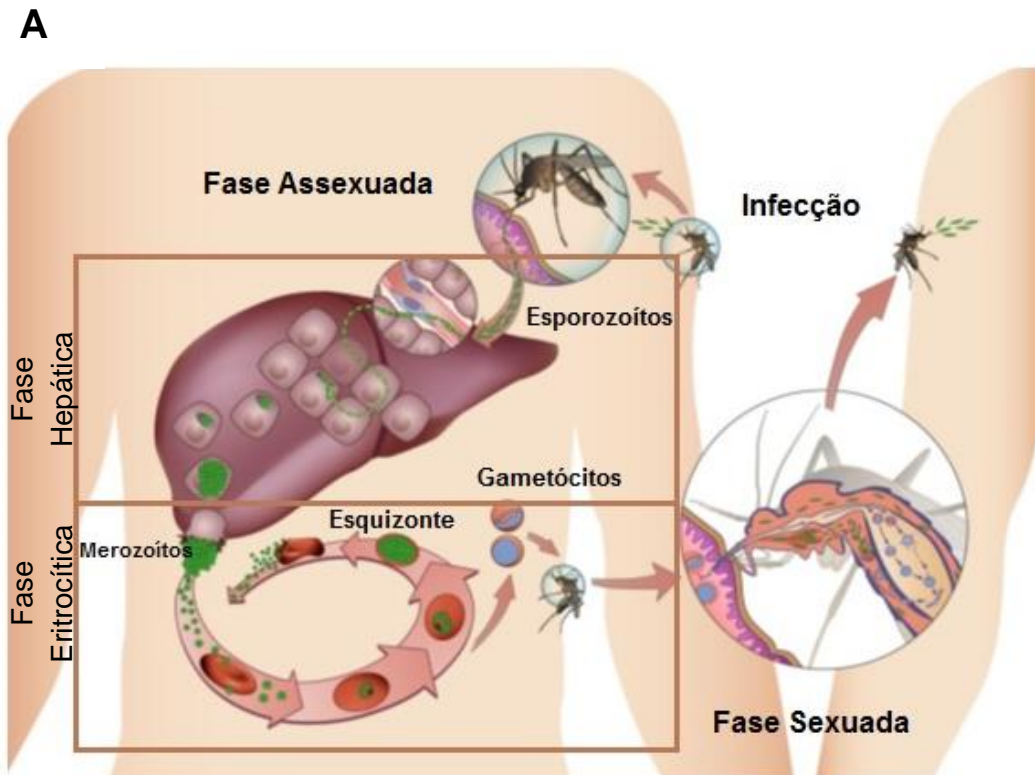


Figura 2: Ciclo de vida do *Plasmodium* no homem (A). Passagem dos merozoítos na corrente sanguínea e ação dos esporozoítos no fígado (B) adaptado de (COWMAN & KAPPE, 2006).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA MALÁRIA

Na fase inicial da doença a sintomatologia é inespecífica, como mal-estar acompanhado de cefaleia, cansaço e mialgia, sendo geralmente precedidos de febre. Em seguida, a febre assume um caráter intermitente, dependendo do tempo de duração do ciclo eritrocítico de cada espécie de *Plasmodium* (LONGLEY et al., 2015).

Na maioria dos casos de infecção por *Plasmodium* não há complicações envolvendo riscos à vida. Contudo, grupos de risco como: mulheres grávidas, crianças, idosos e pessoas imunodeprimidas, são mais suscetíveis a ter uma complicação no quadro de malária (SHARMA; KAUR; SHUKLA, 2012).

O quadro clínico pode variar dependendo da espécie infectante, podendo evoluir para formas clínicas de malária grave, destacando-se forte cefaleia, hipertermia, vômitos, sonolência e convulsões (nos casos de malária cerebral), disfunção hepática, hemoglobinúria, dentre outros, que podem levar a óbito em cerca de 10% dos casos. Em exames hematológicos e sorológicos é comum observar durante a infecção leucopenia, linfopenia, plaquetopenia e danos hepáticos caracterizados pela liberação de transaminases hepáticas no soro (MCCAL et al., 2007).

Como já se sabe, parte do ciclo evolutivo do *Plasmodium* ocorre no fígado, porém pouco se sabe sobre os danos hepáticos nos pacientes. A disfunção hepatocelular associada ao quadro de malária é caracterizada como uma patologia heterogênea, que pode variar desde alterações nos testes de função hepática até uma insuficiência hepática grave. Com isso se faz necessário

estudos que busquem como estas alterações ocorrem, bem como avaliar o efeito de novas substâncias ou antioxidantes no quadro de malária.

1.4 FISIOLOGIA HEPÁTICA E MALÁRIA

A fisiologia hepática compreende importantes funções no organismo, seja no sistema imunológico, no armazenamento de vitaminas e ferro, dentre outras. O fígado é formado pelo parênquima lobular, sendo este constituído pelas seguintes células: hepatócitos, Kupffer e Ito, bem como pelos capilares sinusóides, perissinusoidais e pelos ductos biliares (Figura 3) (CROSSINGHAM et al., 2009).

O fígado possui uma grande população de macrófagos residentes denominados células de Kupffer. Estas células são responsáveis por fagocitar os metabólitos prejudiciais ao corpo e por atuar na detoxificação de endotoxina, além de secretar proteínas que atuam nos processos imunológicos (MORINAGA, 2015; HUANG, et al., 2010).

O hepatócito é uma célula que apresenta grande versatilidade funcional, possuindo funções glandulares endócrinas e exócrinas, desempenhando importantes funções no organismo humano, como a regulação do metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios, secreção da bile, armazenamento de substâncias, bem como na degradação e excreção de hormônios (HU et al., 2015).

Alterações ou disfunções hepáticas são comumente observadas em diversas doenças, como por exemplo, na malária, em que a fase hepática da doença se caracteriza como uma fase de transição entre os esporozoítos

extracelulares, inoculados pelo mosquito vetor, e a fase sanguínea, que é responsável pela progressão da doença (MORINAGA, 2015).

A fase hepática do ciclo, gera diversos danos durante o decurso da doença e frequentemente se estende para outros órgãos, além disso, tais alterações são caracterizadas por serem de patologia heterogênea, com gravidade variável, podendo apresentar quadros de insuficiência hepática, hepatomegalia, icterícia e aumento das enzimas hepáticas (CORONADO, NADOVICH, SPADAFORA, 2014).

Um dos principais achados no decorrer da infecção é a hiperplasia das células de Kupffer, juntamente com a deposição do pigmento malárico conhecido como Hemozoína (Hz) (DEROOST et al., 2014). A Hz é formada a partir da degradação da hemoglobina pelo parasita, mais especificamente na fase intra-eritrocítica do ciclo (WHITTEN et al., 2011).

A hemoglobina é uma metaloproteína e possui quatro grupos heme, após a digestão da hemoglobina o grupo heme é liberado na circulação, o qual é altamente tóxico tanto para o hospedeiro quanto para o parasita, que na tentativa de remover o heme livre, promove a formação do pigmento malárico ou Hz (DEROOST et al., 2014).

Estudos já demonstraram que os danos ocasionados no fígado, como a hepatomegalia, aumento das transaminases e fibrose, podem levar ao aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, levando ao quadro de estresse oxidativo no paciente (CERIOTTI et al., 2010).

No que diz respeito as enzimas hepáticas, estudos já demonstram que os níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são considerados biomarcadores de lesão hepática, uma vez que estas lesões

ou destruição das células hepáticas liberam estas enzimas para a circulação. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto que 80% da AST está presente na mitocôndria. Em várias patologias do fígado essas transaminases têm aparecido com níveis altos, principalmente, nos casos de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e hepatite viral, contudo em outras patologias como infecções parasitárias seus níveis podem estar elevados (KAMADA et al., 2016).

Apesar de diversos estudos demonstrarem a relação entre danos histopatológicos no fígado e o estresse oxidativo decorrente da malária, pouco se sabe a respeito da participação de compostos antioxidantes na possível redução dos danos ocasionados pela infecção com *Plasmodium*. Nesse sentido, a utilização de modelos experimentais de malária sistêmica, proporciona maior abrangência nos estudos clínicos e patológicos da doença.

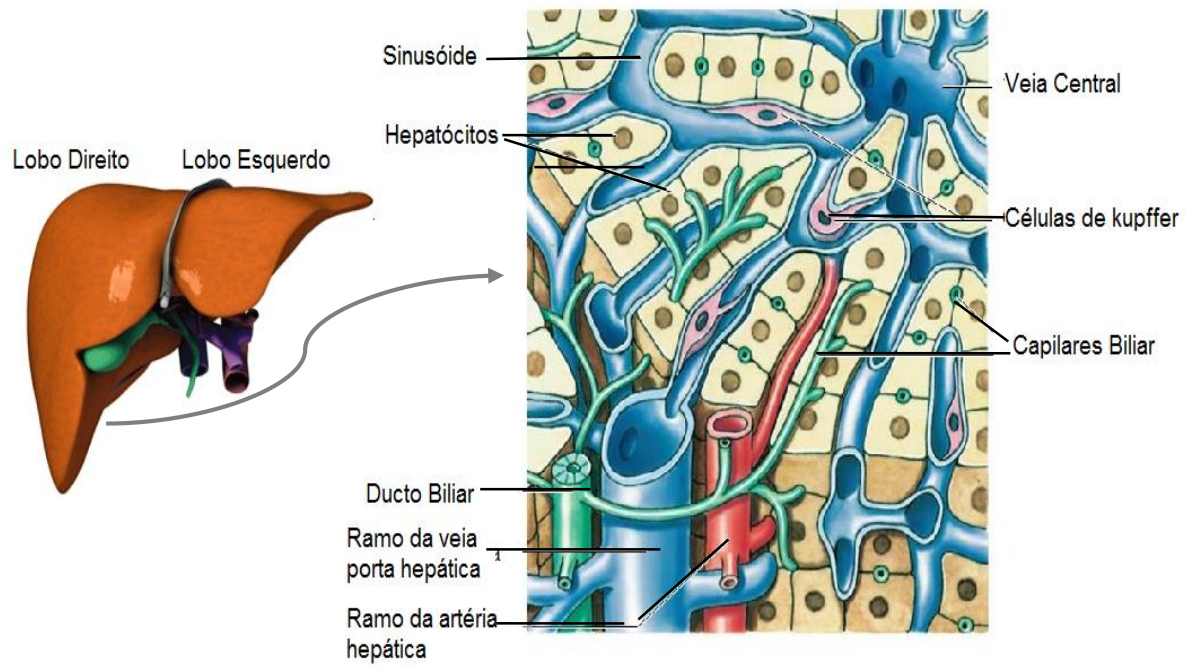


Figura 3: Anatomia do fígado e seus componentes celulares. Adaptado de Crossingham et al., 2009.

1.5 MODELO EXPERIMENTAL

Modelos experimentais utilizando roedores já estão bem caracterizados e estabelecidos na literatura, sendo de extrema importância para a pesquisa científica (BAZIR et al., 2012). Modelos murinos possibilitam investigar mecanismos fisiopatológicos associados a diversas doenças, inclusive malária, uma vez que há algumas similaridades entre a resposta a medicamentos e características patológicas da infecção em humanos e camundongos (LAMB et al., 2006).

A grande diversidade de linhagens de camundongos associada à infecção com diferentes espécies de *Plasmodium* tem contribuído para elucidar alguns aspectos envolvidos na patogênese da doença. Nesse sentido, estudos vem utilizando o *Plasmodium berghei* ANKA, que é uma espécie infectante para roedores. A utilização deste parasita possibilita estudar algumas similaridades das espécies infectantes para o homem (DE SOUZA & RILEY, 2002).

A maioria dos estudos que utiliza modelos murinos de infecção por *P. berghei* ANKA, trabalham com duas linhagens de camundongos, a linhagem resistente como BALB/c que se enquadra como um bom modelo de estudo de malária sistêmica e linhagens susceptíveis: C57BL/6, CBA e Albino Suíço, que são utilizadas uma vez que desenvolvem o quadro de malária cerebral.

Estudos vêm demonstrando que camundongos geneticamente susceptíveis e infectados com a cepa ANKA podem apresentar quadros clínicos de síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) com acidose láctica, anemia e nefrite, indicando que os mesmos podem desenvolver manifestações clínicas semelhantes à malária por *P. falciparum* (VAN DER HEYDE et al., 2001).

Estas linhagens também são capazes de apresentar sinais neurológicos como coma, paralisia e convulsão (MEDANA et al., 1997). Por outro lado, as linhagens resistentes exibem uma resposta diferencial ao parasita, evoluem a óbito em aproximadamente 20-30 dias após a infecção devido à anemia grave e hiperparasitemia (KOSSODO & GRAU, 1993).

1.6 SISTEMA ANTIOXIDANTE E MALÁRIA

O organismo sofre alterações constantemente, seja pela ação dos radicais livres ou pela presença de patógenos. Na tentativa de minimizar os danos causados por esses agentes, um dos principais meios de defesa é o sistema antioxidante. Este sistema compreende desde uma exacerbada oxidação a reações que são essenciais e benéficas para o organismo. Tem como principal função inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação dos radicais livres ou das espécies reativas de oxigênio (ROS) (PERCÁRIO et al., 2012).

Neste contexto, a defesa antioxidante no organismo pode ser dividida em dois grupos, não enzimáticos, sendo provenientes da dieta, a exemplo do ácido ascórbico e tocoferol, e os sistemas enzimáticos, que envolvem as enzimas do ciclo redox, que junto com o sistema não enzimático, vão combater os radicais livres (GINSBURG & GOLENSER, 2003; SOHAIL et al., 2007).

O estresse oxidativo é um importante fator fisiológico, pois a presença de um patógeno, geralmente está associada a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais são responsáveis pelos danos aos componentes celulares (KAPOORE & BANYAL, 2009).

Estudos como o de Guha et al., (2006) sugerem que a geração de ROS desempenha um papel crucial nas complicações sistêmicas da malária. Nas infecções por *Plasmodium* é comumente observada a produção de radicais hidroxila (OH) no fígado, sendo esta uma das principais causas de estresse oxidativo e apoptose.

Espécies reativas de oxigênio são indicadores de danos nos tecidos, com isso as defesas antioxidantes atuam no organismo tentando manter o equilíbrio redox (MOSQUEDA-ROMO et al., 2014). Na malária, é possível observar alterações do estado redox, tais alterações contribuem para manifestação clínica da doença, como anemia, dispneia, dentre outros. Um outro fator que contribui para as manifestações da doença, inclui resposta imune do hospedeiro, produção de óxido nítrico (NO) e produção de ROS (BECKER et al., 2004).

Nesse sentido, a infecção pelo *P. berghei* envolve diversas vias de regulação redox nos diferentes estágios evolutivos da doença, que pode ocorrer por dois mecanismos distintos: o primeiro envolve a degradação da hemoglobina do hospedeiro pelo parasita intracelular, ocorrendo a oxidação do óxido ferroso (Fe^{+2}) para a forma óxido férrico (Fe^{+3}) após a separação da heme da globina, produzindo assim elétrons que vão reagir com o oxigênio molecular formando a ROS (KANZONK, et al., 2010). O segundo mecanismo é o resultado da ativação da resposta imune do hospedeiro, no qual vai haver a produção de citocinas ($\text{TNF-}\alpha$ e $\text{INF-}\gamma$) que levam a ativação dos fagócitos e produção ROS. (PABON et al., 2003; KUMAR & BANDYOPADHYAY, 2005).

1.6.1 Glutathiona

A Glutathiona, é um tripeptídeo (γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) (Figura 4A), que existe no organismo de duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Geralmente atua de forma direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, processos esses que incluem a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (GINSBURG & GOLENSER, 2003).

A glutathiona é sintetizada no meio intracelular e sua síntese depende da biodisponibilidade dos aminoácidos (AA), mais especificamente a cisteína, uma vez que este AA dentre os três é o mais escasso na dieta. Sua síntese ocorre em duas etapas consecutivas, primeiro ocorre o transporte de cistina por transpeptidases de membrana para o interior da célula, o qual será quebrada em moléculas de cisteína (AYER, 2010). Em seguida, pela ação da enzima γ-glutamilcisteína sintetase ocorre a ligação de cisteína e glutamato, formando o resíduo γ-Glu-CisH, que será posteriormente ligado a molécula de glicina através da ação da enzima glutathiona sintetase, formando a molécula de glutathiona (Figura 4B) (BALLATORI, et al, 2009).

A GSH é uma molécula que participa de diversos processos metabólicos no organismo, atuando principalmente como um antioxidante, além realizar a detoxificação de xenobióticos, e atuar no transporte de AA, manutenção de enzimas e proteção contra danos oxidativos (KAPOORE & BANYAL, 2009).

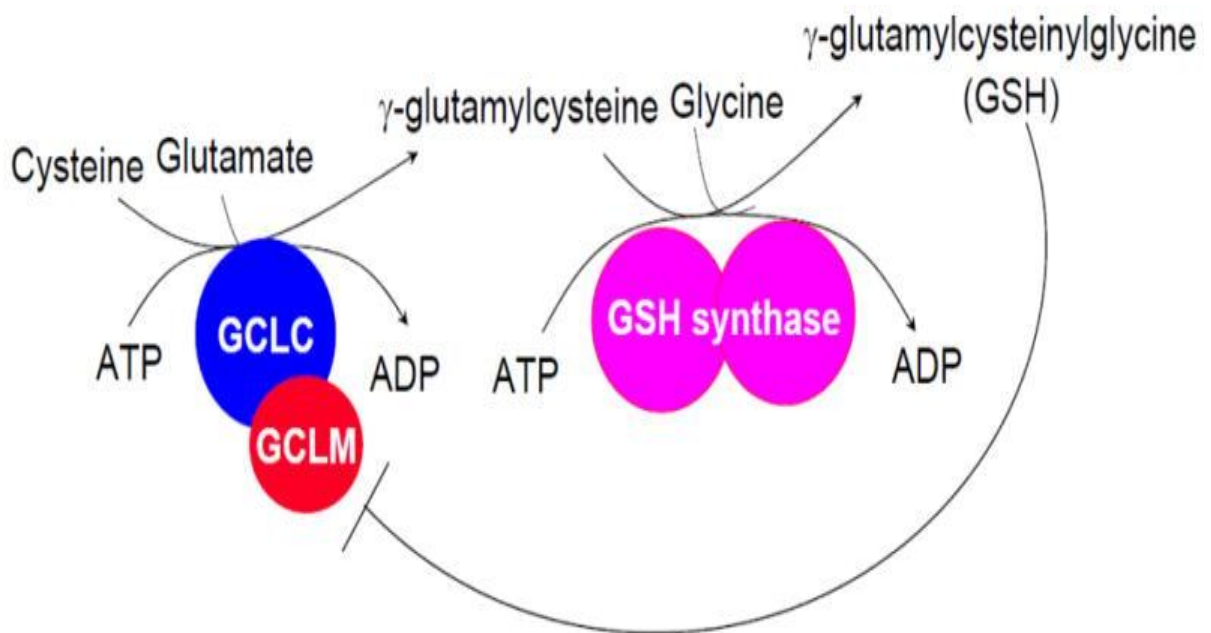


Figura 4: Molécula da Glutathione (A). Síntese da Glutathione. A síntese da GSH ocorre em duas etapas: catalisada pela γ -glutamil-cisteína-sintetase e pela glutathione-sintetase (B). Shelly, 2013.

Como descrito anteriormente a glutathione participa de diversos processos fisiológicos no organismo humano, atuando principalmente no equilíbrio redox intracelular, já no que diz respeito ao parasita da malária, principalmente o *Plasmodium vivax* e *Plasmodium berghei*, estudos apontam que esta molécula tem contribuído para a resistência a cloroquina e artesunato, porém pouco se sabe sobre este mecanismo de resistência (VEGA-RODRÍGUEZ et al., 2015).

Já se sabe a respeito do papel da glutathione no metabolismo do parasita, bem como sua relação com a resistência as drogas utilizadas no tratamento da malária como o artesunato e a cloroquina, porém ainda não se sabe sobre seu efeito quando administrado no hospedeiro com malária, daí a importância de estudar como esta molécula vai agir frente a uma infecção por *Plasmodium*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento com glutaciona na evolução do quadro de malária murina induzida pela infecção com cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o quadro clínico de malária a partir da determinação da curva de sobrevivência, níveis de parasitemia e alteração no ganho de massa corpórea em camundongos Balb-c inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA).
- Caracterizar as possíveis alterações histológicas do tecido hepático de camundongos Balb-c inoculados com PbA no 10^o pós infecção.
- Avaliar as possíveis alterações funcionais do tecido hepático pela determinação dos níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubinas total e bilirrubina direta, no plasma de camundongos Balb-C inoculados com PbA no 10^o pós infecção.
- Caracterizar o efeito da glutaciona nas doses 1, 3 e 8mg/kg sobre o desenvolvimento do quadro de malária em camundongos Balb-c c inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA).

- Avaliar o efeito da glutathione sobre as possíveis alterações histológicas do tecido hepáticos de camundongos Balb-c c inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA).
- Avaliar o efeito da glutathione sobre as possíveis alterações funcionais do tecido hepático pela determinação dos níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubinas total e bilirrubina direta, no plasma de camundongos Balb-C inoculados com PbA no 10^o pós infecção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Balb-C (fêmeas e machos), com idade entre 6-8 semanas pós-natal, pesando aproximadamente 25-30 gramas, adquiridos do biotério central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, contendo no máximo 5 camundongos por gaiola, mantidos em condições assépticas, com água e comida (NUVITAL) *ad libitum* e sob condições de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) controlada. As normas éticas para pesquisa com animais de laboratório foram respeitadas, estando este projeto aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animal (CEUA) parecer 191-14.

3.2 INDUÇÃO DO QUADRO DE MALÁRIA EXPERIMENTAL

Para indução da malária foi utilizada a cepa ANKA de *Plasmodium berghei*, obtida no Instituto Evandro Chagas (Ananindeua-Pa). Inicialmente, uma alíquota de sangue foi descongelada e inoculada em um camundongo Balb-C por injeção intraperitoneal (i.p). Ao atingir entre 5-10% de parasitemia, o sangue foi coletado por punção cardíaca com o auxílio de uma seringa de insulina contendo PBS/EDTA (NaCl 137 mM; KCl ,2,7 mM; Na₂HPO₄ 0,8 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM; EDTA 10%; pH 7.4). Para garantir que uma inoculação uniforme nos diferentes grupos, os animais foram inoculados via i.p com inóculo de 10^6

eritrócitos parasitados diluído em 100µl de PBS. A quantificação dos eritrócitos parasitados foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer através do número total de eritrócitos em suspensão pela porcentagem de parasitemia.

3. 3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO COM GLUTATIONA (GSH)

Para a realização dos experimentos os camundongos foram divididos em grupos controles (n=6) e grupos infectados e grupos infectados que receberam tratamento (n=7) (Tabela 1), sendo que os grupos controles receberam apenas 100µl de PBS e receberam o tratamento com glutathione nas doses de 1, 3 e 8 mg/kg afim de se verificar se esta molécula por si só, não estaria ocasionando algum dano ao animal. Os grupos infectados receberam PBS e os grupos infectados+tratamento receberam glutathione nas doses de 1, 3 e 8 mg/kg a partir do dia 0 pós-infecção durante 7 dias consecutivos.

Grupo	Tratamento
Grupos controle	PBS
	1 mg/Kg de GSH
	3 mg/Kg de GSH
	8 mg/Kg de GSH
Animais infectados	PBS
	1 mg/Kg de GSH
	3 mg/Kg de GSH
	8 mg/Kg de GSH

Tabela 1: Organização dos grupos experimentais de acordo com os tratamentos.

**Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Glutathione (GSH).

3.4 AVALIAÇÃO DO QUADRO DE MALÁRIA EXPERIMENTAL

Para avaliar o quadro de malária, foi realizado o acompanhamento de sobrevivência, variação da massa corpórea e evolução da parasitemia dos camundongos Balb-c inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* nos dias pós-infecção em todos os grupos. A curva de sobrevivência foi obtida a partir da determinação do número de animais que evoluíram a óbito em seus respectivos dias pós-infecção (d.p.i).

Para o monitoramento da massa corpórea, os camundongos foram pesados antes da infecção, para saber sua massa corpórea. Após serem infectados com a cepa PbA, passaram a ser pesados de 3/3 dias com o auxílio de uma balança analítica.

Para determinação da parasitemia foram feitas distensões sanguíneas delgadas em lâminas histológicas a partir da obtenção de uma gota de sangue da veia da cauda do animal. Após o período de secagem das lâminas, estas foram fixadas com metanol absoluto (P.A) durante 2 minutos e, posteriormente coradas pelo método de Giemsa (10%) por 15 minutos.

A porcentagem de parasitemia de cada animal foi determinada pela razão entre a quantidade de eritrócitos parasitados e a quantidade total de células (1000 células por distensão). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (NIKON, modelo E200) com óleo de imersão (1000x maximização final). As contagens das células foram realizadas com auxílio do programa ImageJ, o que garante uma maior precisão na porcentagem de parasitemia de cada animal. A determinação da parasitemia foi realizada de 3 em 3 dias, até que o animal evoluísse a óbito.

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{número de eritrócitos parasitados}}{1000}$$

1000

3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICAS

3.5.1 Cortes Histológicos

Para avaliar as alterações histopatológicas no fígado, foram realizados cortes histológicos do tecido hepático de camundongos Balb-c controles, infectados com PbA e tratados com a GSH 8mg/kg no 10^o d.p.i.

Inicialmente, os animais foram anestesiados e o fígado foi coletado. As amostras foram fixadas em bouin (Ácido pícrico 750ml; Formol 250ml e Ácido acético 5ml) por 48 horas. Em seguida, foram armazenadas em gaze e progressivamente desidratadas em soluções com gradiente de concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) durante 30 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram diafanizadas em xilol (PA) duas vezes durante 30 minutos e parafinizadas (58-60°C) por 40 minutos (2x), formando blocos de parafina. Os blocos então foram cortados com auxílio de micrótomo em uma espessura de 5µm, seguido da montagem das lâminas histológicas. Em seguida, foi realizada a desparifinização durante 24 horas em estufa de secagem a 56°C, seguido da hidratação dos cortes através de uma sequência banhos em xilol I, xilol II, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool 95%, 90%, 80%, 70% por 3 minutos cada, e água destilada por 5 minutos cada.

3.5.2 Coloração de Hematoxilina e Eosina

Para avaliar a organização do tecido hepático, foi utilizado a técnica de coloração de hematoxilina e eosina (HE). Para essa coloração as lâminas com os cortes histológicos foram inicialmente diafanizadas em xilol por 30 segundos, seguido de banhos de álcool em concentração crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) por 30 segundos. Após isso as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavadas em água destilada corrente por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em eosina por 30 segundos e então lavadas novamente em água destilada corrente por mais 5 minutos. Após esse último passo, as lâminas foram montadas em Permount® (Fisher Scientific. New Jersey, USA).

Para análise dos cortes foi utilizado um microscópio de luz (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com câmera digital (Nikon, DXM 1200, Japan) acoplada. As quais foram armazenadas para posterior análise qualitativa, além disso foi realizado a análise histológica conforme os parâmetros de esteatose, hiperplasia das células de Kupffer, congestão sinusoidal e deposição do pigmento malárico (Tabela 2).

Alterações histopatológicas	Gradação histopatológica			
	0	1	2	3
Esteatose	Nenhuma mudança	<10%	10-50%	> 50%
Hiperplasia das Células de Kupffer	<20	20-35	36-50	> 50
Congestão sinusoidal	Sem congestão	Congestão leve	Congestão moderada	Congestão grave
Deposição da Hemozoína	Sem deposição	Deposição leve	Deposição moderada	Deposição grave

Tabela 2: Esquema de classificação das Alterações histopatológicas avaliadas no tecido hepático. Adaptado de Viriyavejakul et al., 2014.

3.6 ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Para realização desses parâmetros após 10 dias de infecção, os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina (i.p.) e sacrificados, sendo feita a coleta do sangue por punção cardíaca, utilizando-se seringa de insulina e agulha. Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, os ensaios foram realizados utilizando kits comerciais específicos para quantificação de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubinas total e bilirrubina direta.

3.7 ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo ANOVA (análise de variância) seguido do pós-teste *Tukey-Kramer* (para análise de três ou mais grupos). Todos os testes foram realizados com uso do programa estatístico BioEstat versão 5.0, considerando como significativo $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO E EFEITO DA GLUTATIONA SOBRE O QUADRO DE MALÁRIA

4.1.1 Curva de sobrevivência, Parasitemia e Variação no ganho de massa corpórea

Antes de caracterizarmos o efeito da glutatona na evolução do quadro clínico da malária experimental, foi avaliado uma série de parâmetros com o intuito de padronizar o desenvolvimento do quadro de malária nos grupos inoculado com a cepa PbA.

Inicialmente, foi avaliada uma possível alteração no ganho de massa corpórea dos animais infectados que receberam GSH ou PBS no decorrer dos dias pós-infecção. A massa corpórea dos animais foi mensurada de 3 em 3 dias pós-infecção, permitindo observar que a infecção com a cepa PbA ocasionou alteração no ganho de massa corpórea dos camundongos Balb-C no decorrer da evolução da doença. Entre o dia 0 e o 24^o d.p.i observou-se uma diminuição significativa da massa corpórea em todos grupos, não havendo diferença entre eles (PbA= $27 \pm 1,78$; PbA+GSH 1mg= $31,33 \pm 0,81$; PbA+GSH 3mg= $26,66 \pm 1,21$; PbA+GSH 8mg= $29,42 \pm 0,78$ VS PbA= $16,5 \pm 0,70$; PbA+GSH 1mg = 16 ± 0 ; PbA+GSH 3mg= $15 \pm 1,50$; PbA+GSH 8mg= 16 ± 0 ; $F[3,24]=1,74$; $p<0.05$) (Figura 5).

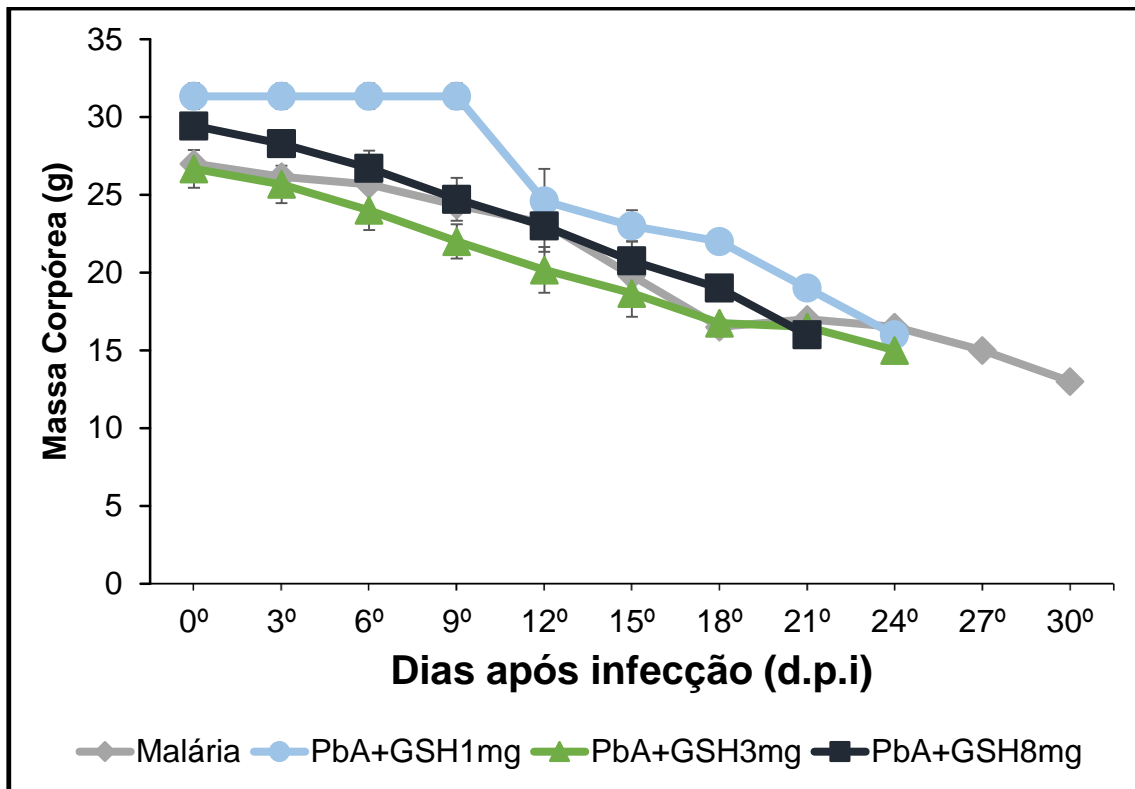


Figura 5: Avaliação da alteração da massa corpórea de camundongos Balb-C infectados com a cepa PbA tratados com GSH ou PBS. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Malária, PbA+GSH 1mg/Kg; PbA+GSH 3 mg/Kg e PbA+GSH 8 mg/Kg (n = 7 animais). Dados apresentados em Média±Erro Padrão; $p < 0.05$.

Foi avaliado o curso temporal da doença obtido a partir do monitoramento diário da taxa de sobrevivência desses animais após o início da infecção. Durante este período, foi possível observar que a inoculação dos camundongos Balb-C com a cepa PbA resultou em uma infecção crônica e letal que se iniciou no 17º d.p.i., mantendo-se até o 29º d.p.i., com uma significativa diminuição na taxa de sobrevivência entre 17º e o 23º d.p.i., (Figura 6). Contudo, ao avaliarmos o efeito da glutathiona sobre o desenvolvimento do curso temporal da doença pode-se observar que as doses de 1 e 8 mg/Kg de GSH diminuíram a sobrevivência dos animais infectados tratados com GSH, visto que esses animais tratados evoluíram a óbito a partir 13º d.p.i. mantendo-se até o 25º d.p.i., com uma significativa diminuição na taxa de sobrevivência entre 17º e o 19º d.p.i.

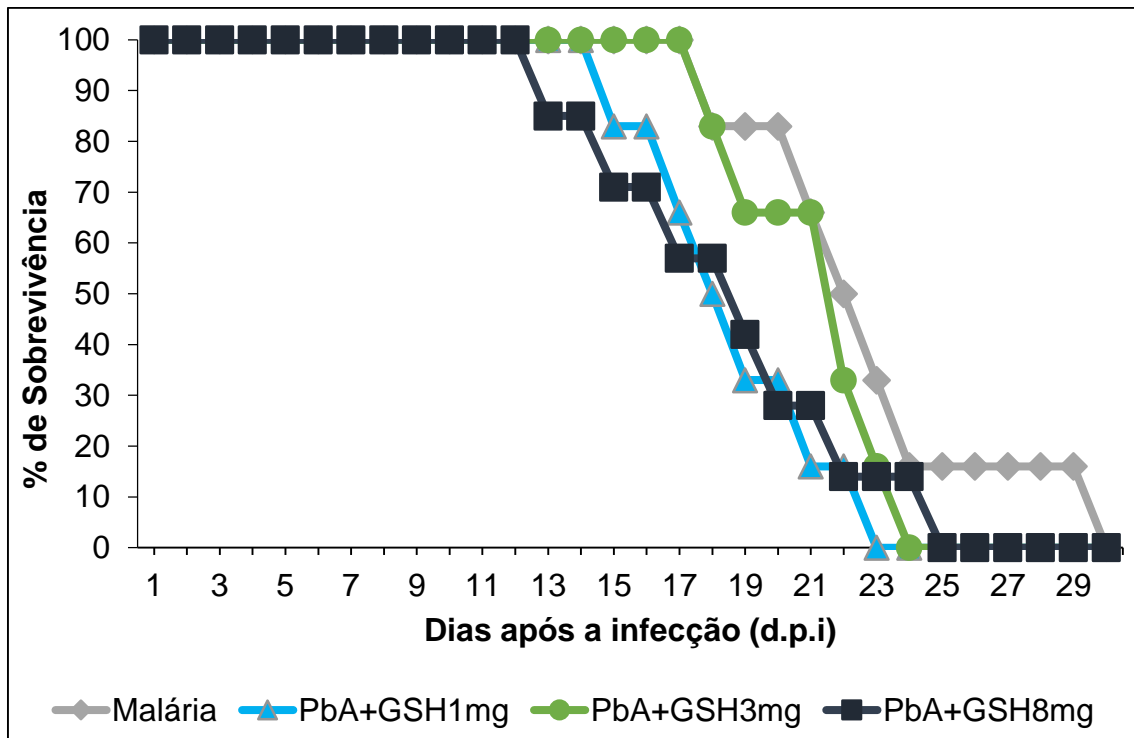


Figura 6: Avaliação do curso temporal da malária em camundongos Balb-C infectados com a cepa PbA co-tratados com GSH ou PBS. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Malária, PbA+GSH 1mg/Kg; PbA+GSH 3 mg/Kg e PbA+GSH 8 mg/Kg.

A evolução da parasitemia também foi acompanhada a partir da obtenção de distensões sanguíneas delgadas a cada 3 dias pós-infecção. Durante esta análise, observou-se uma progressão lenta e contínua na porcentagem de parasitemia, demonstrando no 3º d.p.i a presença dos diferentes estágios do parasita na fase eritrocítica em todos os grupos infectados tratados ou não com GSH (Figura 7 A, B, C, D). Somado a isso, no 3º d.p.i, foi observada uma parasitemia inicial de ~5% que aumenta gradativamente no decorrer dos dias pós-infecção em todos os grupos (Figura 8). O acompanhamento da parasitemia demonstrou que os camundongos Balb-C apresentaram uma alta parasitemia no momento do óbito, em torno de 35-40%, não apresentando diferença estatística na % de parasitemia entre os grupos durante a evolução da doença (Malaria= 21,62,99±1,69%; PbA+GSH 1mg= 20,95±0,83; PbA+GSH 3mg= 20,51±0,66; PbA+GSH 8mg= 20,64±0,99%; F[3,34]=0,008; p=0.99) (Figura 8).

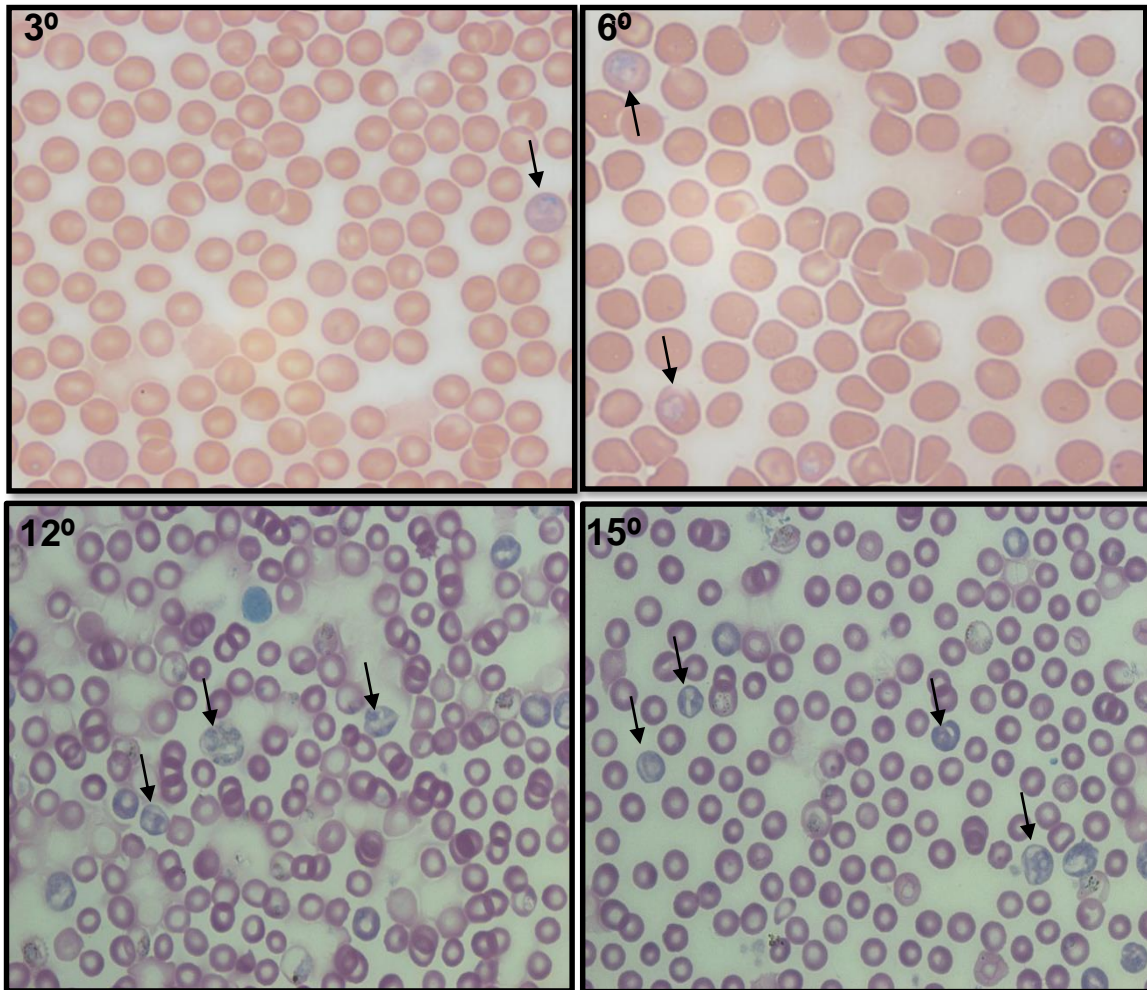


Figura 7: Fotomicrografias de distensões sanguíneas coradas pelo método de Giemsa (1000x) dos grupos infectados no 3º, 6º, 12º e 15º d.p.i. As setas marcam a presença dos diferentes estágios eritrocíticos do protozoário.

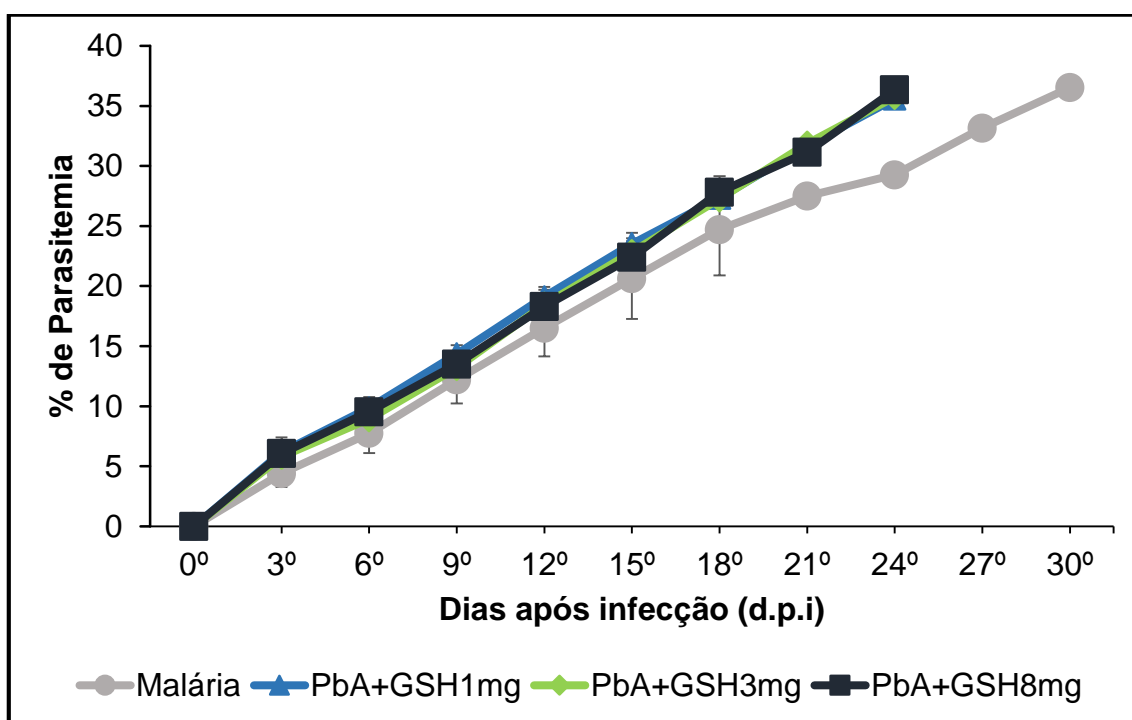


Figura 8: Evolução da parasitemia de camundongos Balb-c infectados com a cepa PbA co-tratados com GSH ou PBS. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Malária (n= 6 animais)., PbA+GSH 1mg/Kg; PbA+GSH 3 mg/Kg e PbA+GSH 8 mg/Kg (n= 7 animais).

4.2 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PELA COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA

Para caracterização das alterações histopatológicas presentes no fígado dos camundongos Balb-C inoculados com a cepa Pba e tratados com GSH ou PBS foi utilizado a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). A partir disso, foi possível observar a presença de infiltrados celulares, demonstrando o recrutamento de células nos grupos tratados com GSH em comparação com o grupo Malária, principalmente com relação ao grupo que recebeu Glutathione na dose de 8 mg/Kg de GSH (Figura 9).

A Figura 9 (AB) ilustra um corte histológico, mostrando um aparelho porta normal, que consiste da veia hepática, área sinusoidal e com hepatócitos circundantes. Não foram observadas a presença de células inflamatórias e em relação a esteatose nota-se alguns pontos no tecido. No tecido hepático de camundongos infectados com a cepa PbA é possível observar a área sinusoidal um pouco mais alargada, além da deposição do pigmento malárico hemozoína dentro das células de Kupffer hiperplásicas, também nota-se a presença de células inflamatórias no trato portal (Figura 9, CD). No grupo PbA que recebeu tratamento com glutathione 8mg (Figura 9, D), os cortes histológicos mostram uma densa infiltração de células inflamatórias no trato portal. Em maior aumento (Figura 9, EF), é possível observar a hiperplasia das células de Kupffer contendo o pigmento hemozoína. Além disso nota-se que as áreas sinusoidais são frequentemente congestionadas.

As alterações encontradas no fígado podem variar numa escala que vai de 0 a 3, sendo 0 pouca ou nenhuma alteração e 3 seria alterações mais graves,

com isso a tabela 3 mostra o grau das alterações encontradas em todos os grupos. Podemos observar que esta tabela confirma os resultados encontrados nos cortes histológicos, indicando que o grupo PbA que recebeu tratamento com glutathione 8mg sofreu alterações mais graves em relação aos parâmetros como: hiperplasia das células de Kupffer, congestão sinusoidal e deposição de hemozina, quando comparado com os outros grupos, principalmente no que diz respeito a hiperplasia das células de Kupffer com deposição do pigmento malárico.

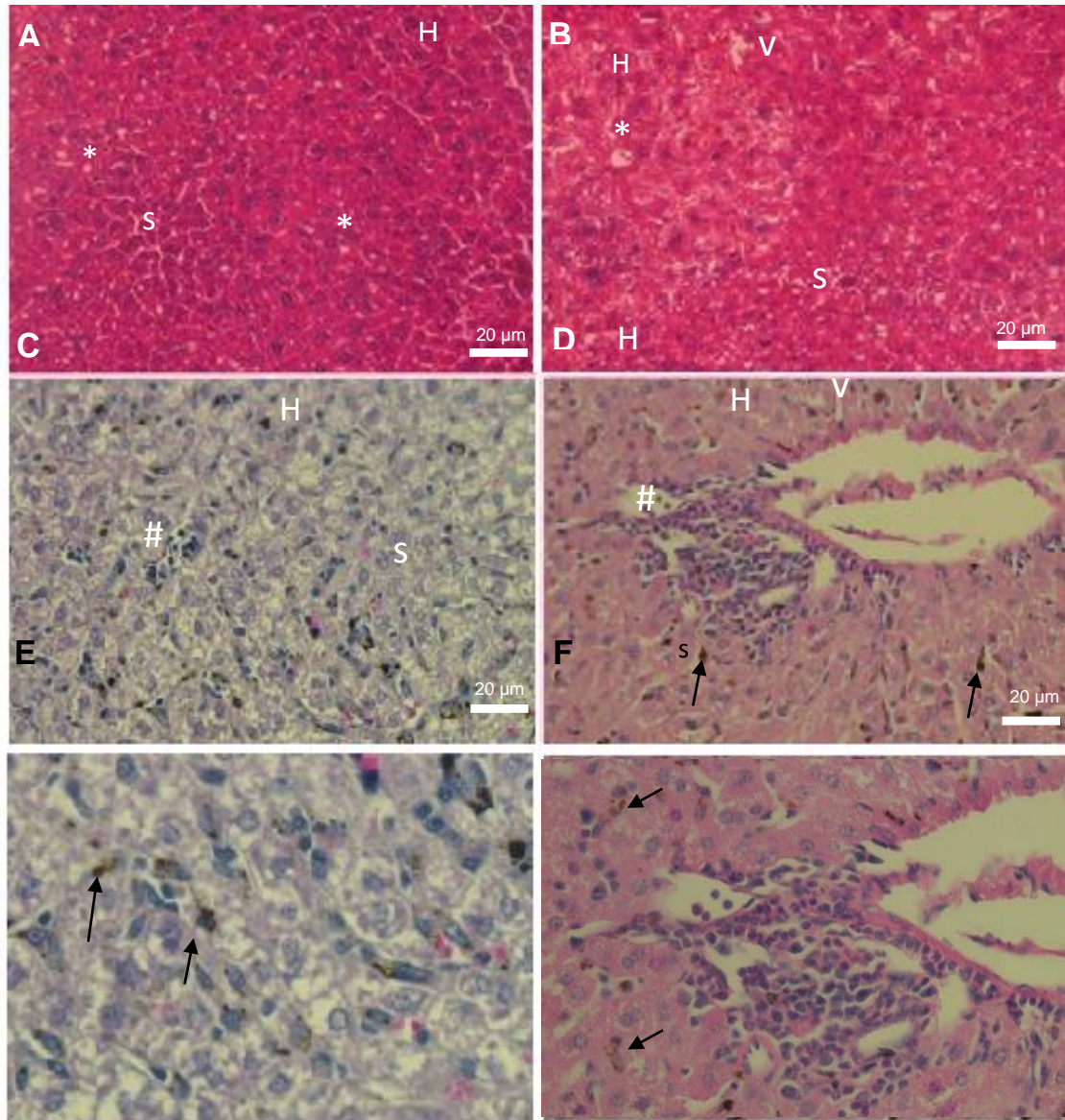


Figura 9: As alterações histopatológicas do fígado do grupo controle (A), grupo glutathiona 8 mg/kg (B), grupo malária cepa PbA (C) e grupo malária tratado com glutathiona 8 mg/kg (D) Imagens de A-D são mostradas em 200x de ampliação; imagens E e F são mostradas em 400x; barras são de 20 μm. H- Hepatócitos H, V- veia hepática, S- área sinusoidal, Asterisco*- Esteatose, Cerquilha # - Células inflamatórias, Seta- Células de Kupffer com pigmento malárico (hemozoína).

Alterações histopatológicas	Gradação histopatológica			
	Controle	GSH 8mg	Malária	Malária+GSH 8mg
Esteatose	1	1	0	0
Hiperplasia das Células de Kupffer	0	0	2	3
Congestão sinusoidal	0	0	1	2
Deposição da hemozoína	0	0	1	2
Total	1/12	1/12	4/12	7/12

Tabela 3: Gradação Histológica do tecido hepático de camundongos infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei*.

4.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS NO PLASMA DE CAMUNDONGOS

Uma vez que foi demonstrado que o tecido hepático estava sofrendo alterações, buscou-se então a caracterização das alterações bioquímicas, através da dosagem dos indicadores de lesão hepática presentes no fígado, dos camundongos Balb-C inoculados com a cepa PbA e tratados com GSH ou PBS. A partir disso, podemos observar que houve um aumento da atividade da transaminase AST no grupo infectado com a cepa PbA, o que já era esperado, uma vez que a literatura reporta que tais alterações são comumente observadas durante o decurso da doença, porém quando foi administrado o tratamento com glutathiona na dose 8 mg/kg, podemos observar que esse aumento foi bem mais acentuado quando comparado com o observado na literatura do grupo Pba (Figura 10). Apresentando diferença estatística nos níveis dessas transaminases entre os grupos PbA+glutathiona 8mg e PbA ($p < 0,05$); grupos PbA+glutathiona 8mg e PbA em relação ao controle ($p < 0,001$).

O mesmo pode ser observado na dosagem da transaminase ALT, que quando quantificada, foi observado que seus níveis estavam aumentados no grupo que recebeu o tratamento com glutathiona na dose de 8 mg/kg quando comparado com o grupo malária (Figura 11) ($p < 0,001$).

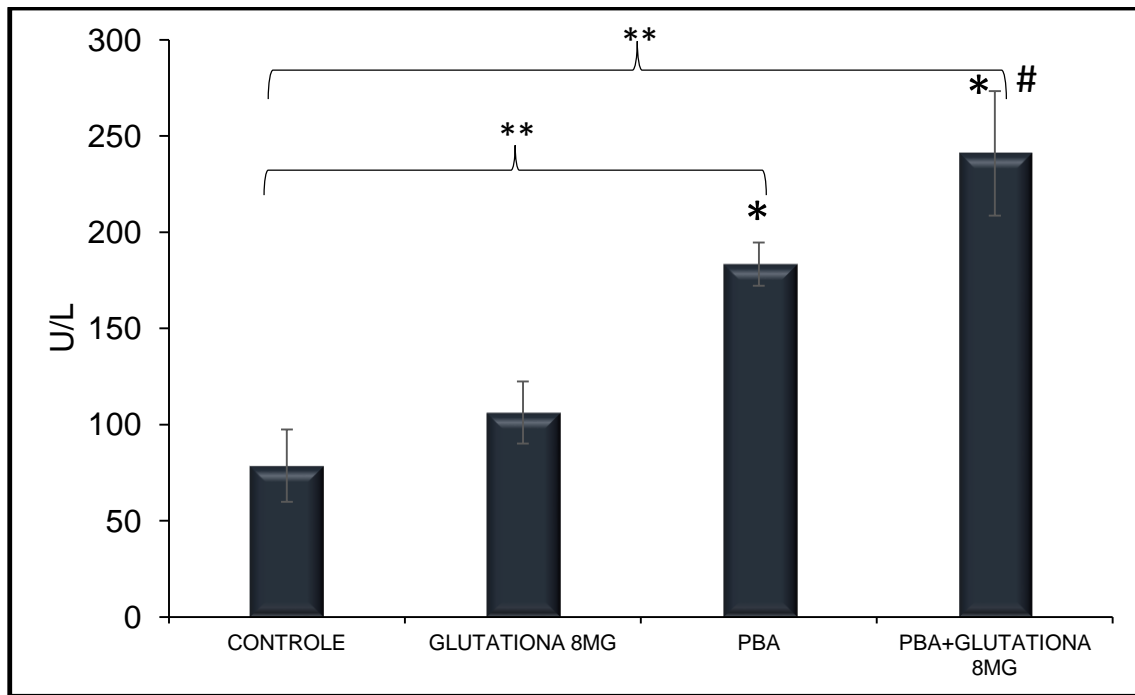


Figura 10: Concentração dos níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) no plasma de camundongos Balb-C no 10^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10⁶ de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Controle (sem infecção); Glutaciona 8mg (sem infecção); PbA e PbA+Glutaciona 8 mg/Kg. * p<0,001 vs controle; # p<0,05 vs PbA; ** p<0,001 vs glutaciona 8mg. Dados apresentados em Média±Erro Padrão.

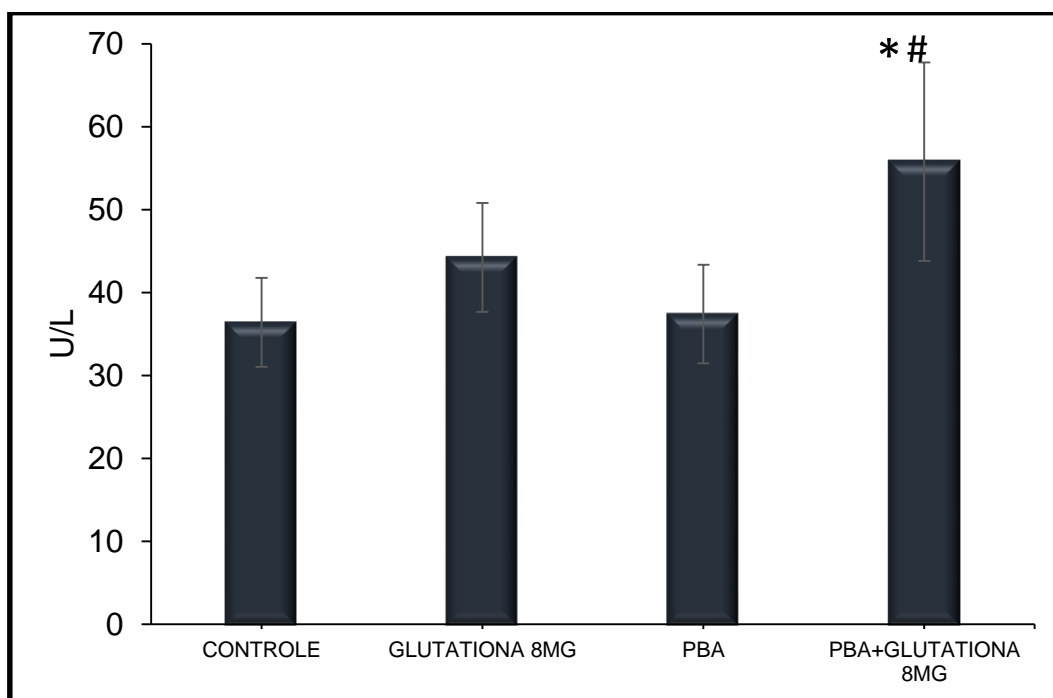


Figura 11: Concentração dos níveis de Alanina Aminotransferase (ALT) no plasma de camundongos Balb-C no 10^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10⁶ de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Controle (sem infecção); Glutaciona 8mg (sem infecção); PbA (infectado) e PbA+Glutaciona 8 mg/Kg. * p<0,001 vs controle; # p<0,05 vs PbA. Dados apresentados em Média±Erro Padrão.

Em relação as dosagens de bilirrubina total (Figura 12), foi possível observar que esta enzima esteve aumentada no grupo PbA o que já é esperado numa infecção por *Plasmodium*, porem quando se observa seus níveis no grupo PbA que foi tratado com glutathione 8mg, seus níveis foram superiores ($p < 0,05$), o mesmo pode ser observado na dosagem da bilirrubina direta, que quando quantificada, foi observado que seus níveis estavam aumentados no grupo que recebeu o tratamento com glutathione na dose de 8 mg/kg quando comparado com o grupo PbA (Figura 13) ($p < 0,001$). Quando analisamos os grupos controle e glutathione 8mg, podemos observar que não sofreram alterações quanto a dosagens dessas enzimas, indicando que o tratamento com glutathione no animal saudável não altera os níveis dessas transaminases e nem altera a histologia do tecido hepático.

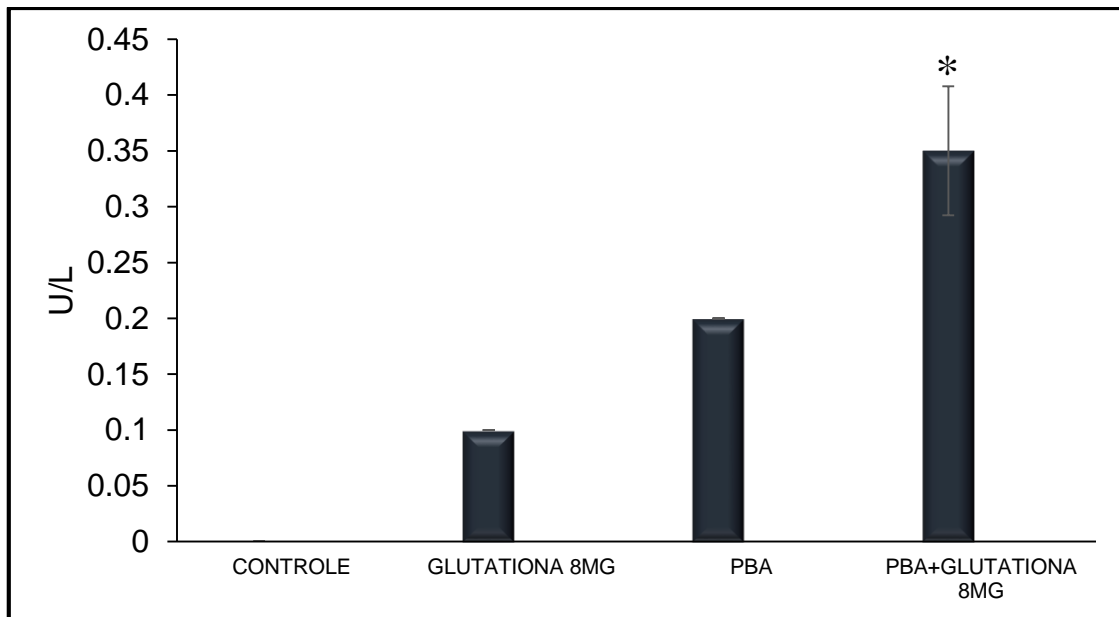


Figura 12: Concentração dos níveis de Bilirrubina Total no plasma de camundongos Balb-C no 10^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10⁶ de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Controle (sem infecção); Glutaciona 8mg (sem infecção); PbA e PbA+Glutaciona 8 mg/Kg. Dados apresentados em Média±Erro Padrão; p<0.05.

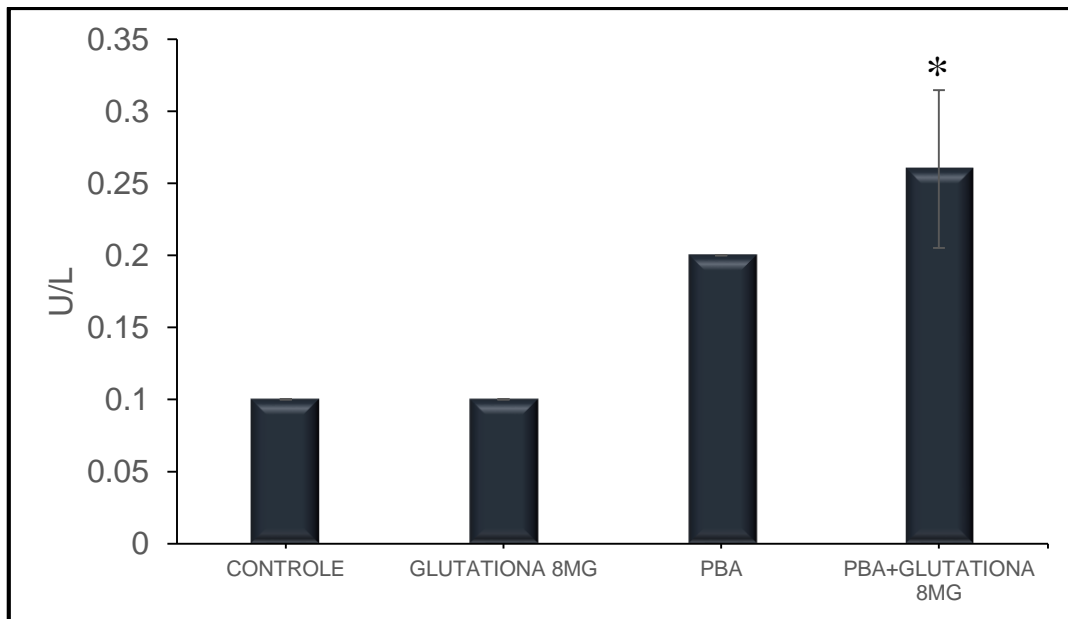


Figura 13: Concentração dos níveis de Bilirrubina Direta no plasma de camundongos Balb-C no 10^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10⁶ de eritrócitos parasitados, apresentando quatro grupos experimentais: Controle (sem infecção); Glutaciona 8mg (sem infecção); PbA e PbA+Glutaciona 8 mg/Kg. Dados apresentados em Média±Erro Padrão; $p < 0.01$.

5 DISCUSSÃO

A Malária é uma doença infecciosa, de caráter agudo ou crônico, que apresenta mecanismos complexos, que podem levar a um quadro de malária mais grave e subseqüentemente ao óbito. Estudos apontam que as principais alterações encontradas durante o decurso da doença encontram-se relacionadas com as alterações respiratórias, renais e hepáticas (VIRIYAVEJAKUL; KHACHONSAKSUMET; PUNSAWAD, 2014). Alguns estudos demonstram que o desenvolvimento dessas alterações, principalmente a hepatopatia que é comumente observada no quadro de malária sistêmica pode gerar um aumento das espécies reativas de oxigênio, levando a um quadro de estresse oxidativo (BECKER, et al., 2004). Diante disso, o presente trabalho se propôs avaliar as alterações histopatológicas do fígado, bem como avaliar a utilização de um antioxidante, a glutathiona, com a finalidade de verificar seu efeito sobre o a infecção.

Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizou-se um modelo experimental de malária, camundongos Balb-c inoculados com a cepa ANKA de *P. berghei* (PbA), sendo este um modelo muito utilizado para avaliar quadro de malária sistêmica.

Estudos de Van der Heyde et al (2001), demonstraram que camundongos Balb-c inoculados com a cepa PbA são linhagens muito utilizadas, uma vez que apresenta as principais características associadas a doença como a presença de sinais clínicos, bem como o aparecimento de quadros como síndrome da angustia respiratória, nefrite e disfunção hepatocelular.

Antes de avaliarmos as alterações no tecido hepático, inicialmente foi realizado a padronização do quadro de malária sistêmica nos camundongos Balb-c inoculados com a cepa PbA, através da análise de diversos parâmetros como variação na massa corpórea, taxa de sobrevivência e parasitemia. Ao avaliarmos esses parâmetros em nosso trabalho, observamos semelhanças ao encontrado na literatura, o qual sugere que os camundongos resistentes evoluem para óbito entre o 15^o-30^o dia após a infecção com a cepa PbA (TANIGUCHI et al., 2015). Contudo, nossos resultados demonstram que ao aplicarmos o tratamento com glutathione na dose de 8 mg, esta molécula acelera a mortalidade desses camundongos que evoluem para óbito entre o 13^o-24^o dia.

Com relação a parasitemia, foi observado que os animais que foram inoculados com a cepa PbA e os animais infectados que receberam tratamento com glutathione nas doses 1, 3 e 8 mg/kg apresentaram um aumento na parasitemia entre os dias 3-24^o pós-infecção o que é normal em decorrência da evolução da doença, porém quando se compara os grupos, nota-se que o tratamento com glutathione não alterou a parasitemia desses animais. Estudos de Gomes et al., (2015), mostraram que camundongos infectados com a cepa PbA, os níveis de parasitemia aumentaram em uma escala temporal.

Além da taxa de sobrevivência e parasitemia, também foi avaliado uma possível alteração no ganho ou perda de massa corpórea dos animais controles, infectados com a cepa PbA e infectados que receberam tratamento. Verificamos que não houve alteração no ganho de massa corpórea dos animais em decorrência do tratamento com glutathione, havendo, uma perda da massa corpórea no decorrer dos dias pós-infecção, sendo esta perda decorrente de alterações como anemia e ataxia. Taniguchi et al., (2015) e Sharma, Kaur &

Shukla (2012), observaram em seus estudos uma variação da massa corpórea, contudo essa variação ocorreu em decorrência da evolução da doença.

Uma vez padronizado o quadro malária experimental nos camundongos Balb-c utilizados no presente trabalho, foi então avaliado as prováveis alterações hepáticas dos animais infectados com a cepa PbA, visto que estudos já demonstraram o desenvolvimento de uma hepatomegalia, bem como a ocorrência de icterícia, recrutamento de células mononucleares e elevação das enzimas hepáticas que podem ser observadas em diferentes níveis (DEROOST et al., 2014).

No presente trabalho, foi analisado a histologia do tecido hepático (Figura 10), a partir dessa análise foi possível observar que o tecido hepático dos camundongos infectados com a cepa PbA, sofreram alterações na sua morfologia, comparando com o grupo infectado que recebeu tratamento com glutathione 8mg/kg, observamos que esse grupo sofreu grandes alterações tanto na análise macroscópica quanto microscopia, tendo como principais alterações a hiperplasia das células de Kupffer com deposição do pigmento malárico e infiltrados celulares, mostrando assim que os animais tratados com glutathione apresentam uma piora durante o curso da doença.

Deroost et al., (2014) em seus experimentos encontraram mudanças morfológicas no fígado de camundongos infectados com *P. berghei* ou *Pc AS*, porém não foi relatado a presença necrose, alargamento dos hepatócitos, esteatose, nem danos no ducto biliar, obstrução dos vasos sanguíneos ou obstrução dos canais biliares. Resultados semelhantes com *P. berghei* podem ser vistos em estudos de Rodriguez et al., (1998), sendo estes resultados

condizentes com as lesões hepáticas observada na maioria dos pacientes com malária (WHITTEN et al., 2011).

No que diz respeito às infiltrações mononucleares, essas foram observadas em torno das veias centrais e no parênquima hepático. Corroborando com nossos resultados, Crista (2009), encontrou resultados parecidos na infecção por *Plasmodium chabaudi* AS, como a lesão hepática com recrutamento celular, e também foi observado altas quantidades de Hz em macrófagos hepáticos, além do aumento das transaminases hepáticas dosadas no soro.

Neste sentido, na tentativa de verificar a participação das transaminases nas alterações histológicas do fígado, procuramos quantificar e comparar a os níveis encontrados no plasma de camundongos dos grupos controle, glutathione 8 mg/kg, PbA e PbA tratado com glutathione 8 mg/kg. O grupo glutathione foi analisado a fim de se verificar se esta molécula por si só não estaria ocasionando danos no tecido hepático.

Além das alterações histopatológicas do fígado, foram encontradas alterações nos níveis das transaminases ALT, AST e bilirrubina total e bilirrubina direta no grupo PbA e no grupo PbA tratado com glutathione, no qual o grupo tratado apresentou um aumento dessas transaminases. Ratificando nossos resultados, Levesque, Sullivan & Meshnick (1999) e Deroost et al., (2014) demonstraram um aumento progressivo a partir do 8º dia pós-infecção dos níveis de AST e ALT no plasma camundongos inoculados com *P. berghei* ANKA, *P. berghei* NK65 e *P. chabaudi* AS.

Corroborando com nossos resultados Ignatius, Emeka & Blessing (2008), observaram que a atividade das enzimas hepáticas AST e ALT em humanos e

observaram que essas enzimas estiveram aumentadas durante a infecção e que esse aumento estava relacionado com a percentagem de parasitemia.

Assim uma importante contribuição do presente trabalho foi verificar que quando administrado glutathione na dose de 8 mg/kg via i.p, essa molécula acelera a mortalidade dos animais infectados, bem como intensifica a hiperplasia das células de Kupffer com deposição do pigmento malárico, resultado este que é confirmado pelas alterações nas transaminases hepáticas, indicando assim uma disfunção hepática, essa disfunção por si só gera um aumento das espécies reativas de oxigênio, levando a um quadro de estresse oxidativo. Contudo nossos resultados são bem relevantes para estudos posteriores, uma vez que ainda não se sabe por qual via esta molécula está agindo.

6 CONCLUSÃO

A infecção por PbA apresenta um curso crônico na linhagem de camundongo Balb-c, com manifestações clínicas que se iniciam entre o 3º e 9º dia após a infecção, momento em que a parasitemia começa a aumentar progressivamente até o animal evoluir a óbito.

A análise da histologia do tecido hepático de camundongos Balb-c inoculados com PbA no 10º d.p.i, mostraram alterações no fígado e alterações funcionais do tecido hepático pela determinação dos níveis de AST, ALT, bilirrubinas total e bilirrubina direta, no plasma dos camundongos, quando comparado com o grupo controle.

Ao caracterizarmos o efeito da glutathione sobre o desenvolvimento do quadro de malária em camundongos Balb-c inoculados com a cepa ANKA, observamos que esta molécula acelerou a mortalidade desses animais, porém esse aumento da mortalidade não se encontra associado com aumento da parasitemia e nem da massa corpórea.

Ao avaliarmos o efeito da glutathione sobre as possíveis alterações histológicas do tecido hepáticos de camundongos Balb-c, observamos que as alterações encontradas foram mais evidentes quando comparadas com o grupo malária, essas alterações foram confirmadas quando avaliamos os níveis de AST, ALT, bilirrubinas total e bilirrubina direta, que estiveram aumentadas no grupo tratado, concluindo que ao administrarmos a glutathione na dose de 8 mg/kg, esta acelerou a mortalidades desses animais, bem como ocasionou lesões no fígado que foram mais evidentes como hiperplasia das células de kupffer acompanhado com a deposição de hemozoína e um aumento de das transaminases hepáticas.

7 REFERÊNCIAS

AMINO, R. THIBERGE, S. MARTIN, B. CELLI, S. SHORTE, S. FRISCHKNECHT, F. MÉNARDO, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**. 12:220-224.2006.

AYER, A. et al. The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome. **Free Radical Biology & Medicine**, 10-1016,1-13, 2010.

BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **The Journal of Biological Chemistry**, 390, 191-214. 2009.

BASIR, R. FAZALUL R. S. S. HASBALLAH, K. CHONG, W.C. TALIB, H. YAM, M.F JABBARZARE, M. TIE, T.H. OTHMAN, F. MOKLAS, M.F. ABDULLAH, W.O. AHMAD, Z . *Plasmodium berghei* ANKA Infection in ICR Mice as a Model of Cerebral Malaria. **Iranian Journal of Parasitology**. 2012; 7(4): 62–74.

BECKER, K. TILLEY, L. VENNERSTROM, J.L. ROBERTS, D. ROGERSON, S. GINSBURG, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology**.2004;34(2):163–189.

BERTOLINO, P. BOWEN, D.G. Malaria and the liver: immunological hide-and-seek or subversion of immunity from within? **Frontiers Microbiology**. 6: 41. 2015.

CERIOTTI, F. HENNY, J. QUERALTÓ, J. ZIYU, S. OZARDA. Y. CHEN. B. BOYD, J. C. PANTEGHINI. M. Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and γ -glutamyl transferase (GGT) in serum: results from an IFCC multicenter study. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. 48,1593–1601. 2010.

CORONADO, L.M. NADOVICH, C.T.N. SPADAFORA, C. Malarial Hemozoin:

From target to tool. **Biochimica Biophysica Acta**. June 1840(6): 2032–2041. 2014.

COX-SINGH, J. DAVIS, T.M. LEE, K.S. SHAMSUL, S.S. MATUSOP, A. RATNAM, S. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infectious Diseases**. 46(2):165-71. 2008.

COWMAN, A.F. KAPPE, S.H. Malaria's stealth shuttle. **Microbiology**. 2006 Sep 1;313(5791):1245-6.

COX, F.E.G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**. 2010.

CRISPE, I.N. The liver as a lymphoid organ. **Annual Review Immunology**. 27:147–163; 2009.

CROSSINGHAM, J.L. JENKINSON, J. WOOLRIDGE, N. GALLINGER, S. TAIT, G.A. MOULTON, C.A.E. Interpreting three-dimensional structures from two-dimensional images: web based interactive 3D teaching model of surgical liver anatomy. **HPB – International hepato-pacreato** (Oxford). 2009 Sep; 11(6): 523–528.

DEROOST, K. LAYS, N. PHAM, T. BACI, D. EYNDE, K. V. D. KOMUTA, M. PRATO, M. ROSKAMS, T. SCHWARZER, E. OPDENAKKER, G. STEEN, P. E. V. D. Hemozoin Induces Hepatic Inflammation in Mice and Is Differentially Associated with Liver Pathology Depending on the *Plasmodium* Strain **PLoS One**. 9(11). 2014.

DE SOUZA, J.B. & RILEY, E.M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, 4: 291-300, 2002.

FREVERT, U. ENGELMANN, S. ZOUGBEDE, S. STANGE, J. NG, B. MATUSCHEWSKI, K. ET AL. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. **PLoS Biology**. 3:192. 2005.

GARCIA, L. S. Malaria. **Clinics in Laboratory Medicine**, 30 .93–129.2010.

GINSBURG, H. GOLENSER, J. Glutathione is involved in the antimalarial action of chloroquine and its modulation affects drug sensitivity of human and murine species of Plasmodium. **Redox Report**. 2003;8(5):276-9.

GOMES, B.A.Q. SILVA, L.F.D. Da. GOMES, A.R.Q. MOREIRA, D.R. DOLABELA, M.F. SANTOS, R.S. GREEN, M.D. CARVALHO, E.P. PERCÁRIO, S. N-acetyl cysteine and mushroom *Agaricus sylvaticus* supplementation decreased parasitaemia and pulmonary oxidative stress in a mice model of malária. **Malaria Journal**. 2015; 14: 202.

GUHA, M. KUMAR, S. CHOUBEY, V. MAITY, P. BANDYOPADHYAY, U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. **The FASEB Journal**. 20, 439–449. 2006.

HUANG, W. METLAKUNTA, A. DEDOUSIS, N. ET AL. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **Diabetes**. 2010; 59:347–357.

IGNATIUS, C.M. EMEKA, E. N. BLESSING, N. E. Effect of Malaria Parasitaemia on Liver Enzyme Tests. **International Journal of Tropical Medicine**. 3:49-52, 2008.

KAPOOR, G. & BANYAL, H. S. Glutathione Reductase and Thioredoxin Reductase: Novel Antioxidant Enzymes from *Plasmodium berghei*. **The Korean Journal Parasitology**. 47, 4: 421-424. 2009.

KOSSODO, S. & GRAU, G. E. Profiles of cytokines production in relation with susceptibility to cerebral malaria. **The Journal Immunology**. 151: 4811-4820, 1993.

KUMAR, S. BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicology Lett**. 2005 Jul 4;157(3):175-88. Epub 2005 Apr7.

LAMB, T.J. BROWN, D.E. POTOCHNIK, A.J. LANGHORNE, J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 8(6): 1-22, 2006

LEVESQUE, M.A. SULLIVAN, A.D. MESHNICK, S.R. Splenic and hepatic hemozoin in mice after malaria parasite clearance. **Journal of Parasitology**. 1999; 85:570–573.

LONGLEY, R.J. HILL, A.V.S. SPENCER, A.J. Malaria vaccines: identifying Plasmodium falciparum liver-stage targets. **Frontiers in Microbiology**. 6: 965. 2015.

MEDANA, I.M. HUNT, N.H. CHAN-LING, T. Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria. **Glia**, 19: 91-103, 1997.

McCALL, M.B. NETEA, M.G. HERMSEN, C.C. JANSEN, T. JACOBS, L. GOLENBOCK, D. VAN DER VEM, A.J. SAUERWEIN, R.W. Plasmodium falciparum infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. **Journal Immunology**. 2007 Jul 1;179(1):162-71.

MULLER, S. Role and Regulation of Glutathione Metabolism in *Plasmodium falciparum*. **Molecules**, 20, 10511-10534. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica: caderno 10 malária. **Ministério da Saúde**; 7a ed. Brasília. 2005.

MORINAGA, H. MAYORAL, R. HEINRICHSORFF, J. OSBORN, O. FRANCK, N. HAH, N. WALENTA, E. BANDYOPADHYAY, G. PESSENTHEINER, A. R. CHI, T. J. CHUNG, H. BOGNER-STRAUSS, J. G. EVANS, R.M. OLEFSKY, J.M. OH, D.A. Y. Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. **Diabetes**. 2015 Apr;64(4):1120-30. doi: 10.2337/db14-1238. Epub 2014 Oct 14.

MOSQUEDA-ROMO, N.A. RODRÍGUEZ-MORALES, A.L. BUENDÍA-GONZÁLEZ, F.O. AGUILAR-SÁNCHEZ, M. MORALES-MONTOR, J. LEGORRETA-HERRERA, M. Gonadal steroids negatively modulate oxidative stress in CBA/Ca female mice infected with *P. berghei* ANKA. **BioMed Research International**. Volume 2014 (2014), Article ID 805495.

NG, O.T, OOI, E.E. LEE, C.C. LEE, P.J. NG, L.C. PEI, S.W. et al. Naturally acquired human Plasmodium knowlesi infection, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**. 14(5):814-6. 2008.

PATZEWITZ, E. M. SALCEDO-SORA, J. E. WONG, E. H. SETHIA, S. STOCKS, P. A. MAUGHAN, S. C. Glutathione transport: A new role for PfCRT in chloroquine resistance. **Antioxidant Redox Signaling**. 2013.

PRADEL, G. & FREVERT, U. Plasmodium sporozoites actively enter and pass through Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. **Hepatology** 33(5):1154–1165. 2001.

PERCÁRIO, S. MOREIRA, D. R. GOMES, B. A. Q. FERREIRA, M. E. S. GONÇALVES, A. C. M. LAURINDO, P. S. O. C. VILHENA, T. C. DOLABELA, M. F. GREEN, M. D. Oxidative Stress in Malaria. **International Journal of Molecular Sciences**. 13,16346-16372. 2012.

RODRIGUEZ-ACOSTA, A. FINOL, H.J. PULIDO-MENDEZ, M. MARQUEZ, A. ANDRADE, G. et al. Liver ultrastructural pathology in mice infected with Plasmodium berghei. **Journal of Submicroscopic Cytology Pathology**. 30:299–307;1998.

SADANAND, S. Malaria: an evaluation of the current state of research on pathogenesis and antimalarial drugs. **The Yale Journal of Biology Medicine**. 83. 185 – 191. 2010.

SCHLAGENHAUF, P. Malaria from pre-history to present. **Infectious Disease Clinics North America**. 18:189-205. 2004.

SHELLY, C. L.U. Glutathione synthesis *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Volume 1830, Issue 5, May 2013, Pages 3143–3153.

SHARMA, L. KAUR, J. SHUKLA, G. Role of Oxidative Stress and Apoptosis in the Placental Pathology of Plasmodium berghei Infected Mice. **PLoS ONE**. 7 (3). 2012.

SOHAIL, M. KAUL, A. RAZIUDDIN, M. ADAK, T. Decreased Glutathione-S-transferase activity: diagnostic and protective role in vivax malaria. **Clinical Biochemistry**. 40(5-6):377-82.2007.

SUH, K.N; KAIN, K.C; KEYSTONE, J.S. Malaria. **Canadian Medical Association Journal**. 170(11): 1693-702.2004.

SCHLAGENHAUF, P. Malaria: from prehistory to present. **Infectious Diseases Clinics North America**. 2004 Jun;18(2):189-205, table of contents.

TAVARES, J. FORMAGLIO, P. THIBERGE, S. MORDELET, E. ROOIJEN, N. V. MEDVINSKY, A, MÉNARD, R. AMINO, R. Role of host cell crossing the sporozoite malaria during liver infection. **Journal Experimental Medicine**.210 (5): 905-915.2013.

TUTEJA, R. Malaria – The global disease. **The FEBS Journal**. 274 (2007).

TANIGUCHI, T. MIYAUCHI, E. NAKAMURA, S. HARAI, M. SUZUE, K. IMAI, T. NOMURA, T. HANDA, T. OKADA, H. SHIMOKAWA, C. ONISHI, R. OLIA, A.

HIRATA, J. TOMITA, H. OHNO, H. HISAEDAA, H. *Plasmodium berghei* ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. **Nature**. 2015; 5:15699.

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

VANDERBERG, J. P. FREVERT, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilization of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. **International Journal of Parasitology**. 34 991–996. 2004.

VIRIYAVEJAKUL, P. KHACHONSAKSUMET, V. PUNSAWAD, C. Liver changes in severe *Plasmodium falciparum* malaria: histopathology, apoptosis and nuclear factor kappa B expression. **Malaria Journal**. 2014; 13: 106.

WHITTEN, R. MILNER, DA J.R. YEH, M.M. KAMIZA, S. MOLYNEUX, M.E. ET AL. Liver pathology in Malawian children with fatal encephalopathy. **Human Pathology**. 42 1230–1239.2011.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report**, 2014.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report**, 2015

WHITTEN, R. MILNER, da J.R. YEH, M.M. KAMIZA, S. MOLYNEUX, M.E. et al. Liver pathology in Malawian children with fatal encephalopathy. **Human Pathology**. 42:1230–1239.; 2011.

YOSHIHIRO, K.A.B. RYOTA, H.C.D. HIDENAGA, Y.D. YUKA, Y.D. TETSUO, T.B. YUKO, F.E. KENJI, H.E. EIJI, M. Impact of plasma transaminase levels on the peripheral blood glutamate levels and memory functions in healthy subjects. **BBA Clinical**. 2016 Jun; 5: 101–107.