



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES  
SOBRE AS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS CEREBRAIS E  
PULMONARES EM MALÁRIA MURINA**

BRUNO ALEXANDRE QUADROS GOMES

BELÉM-PA  
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES  
SOBRE AS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS CEREBRAIS E  
PULMONARES EM MALÁRIA MURINA**

**BRUNO ALEXANDRE QUADROS GOMES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Livre-Docente Sandro Percário.

BELÉM-PA  
2011

BRUNO ALEXANDRE QUADROS GOMES

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES  
SOBRE AS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS CEREBRAIS E  
PULMONARES EM MALÁRIA MURINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Banca examinadora:

---

Prof. Livre-Docente Sandro Percário – Instituto de Ciências Biológicas - UFPA.  
ORIENTADOR

---

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira – Instituto de Ciências da Saúde - UFPA

---

Prof. Dr. Flavio de Vasconcelos – Instituto de Ciências da Saúde - UFPA

---

Prof. Dr. Marcelo Conte - Escola Superior de Educação de Educação Física de Jundiaí/ ESEF

Julgado em: 06/09/2011.

Conceito: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio Gomes e Josefa Quadros, pelo pela inestimável contribuição para a minha educação, personalidade e apoio incondicional na minha trajetória acadêmica.

Ao Professor Sandro Percário pelo seu imenso valor humano e profissional, mostrando-me a cada dia o prazer pela ciência e respeito aos princípios éticos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus:

Pela minha Família e a Laura Nogueira, pelo apoio emocional e companheirismo, o que me deu forças para enfrentar todas as dificuldades surgidas no desenvolvimento deste projeto;

Pelo Professor Dr. Sandro Percário por sua dedicação, paciência e grande sabedoria na orientação desta dissertação;

Pela Universidade Federal do Pará (UFPA) e ao Núcleo de Medicina Tropical (NMT) pelo suporte técnico-científico que tem me fornecido para a longa jornada de minha formação como pesquisador;

Pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará e a Secretaria de Estado de Desenvolvimento, Ciência e Tecnologia (FAPESPA/SEDECT) pela concessão de bolsa de mestrado, o que foi crucial para o desenvolvimento deste projeto;

Pelos integrantes do Laboratório de Estresse Oxidativo no apoio das práticas laboratoriais, em especial a Danilo Reymão Moreira, Rafael Quadros, Marcela Figueira e Lúcio Demétrio;

Pelo Laboratório de Neurociências da UFPA, que gentilmente forneceu a cepa do *Plasmodium berghei*;

Pela empresa Cogumelo do Sol Agaricus do Brasil Com., Imp. E Exp. Ltda por acreditar e financiar o projeto;

Por todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*"Antes que você possa alcançar o topo de uma árvore e entender os brotos e as flores, você terá de ir fundo nas raízes, porque o segredo está lá. E, quanto mais fundo vão as raízes, mais alto vai a árvore".*

Friedrich Nietzsche.

*"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo".*

Albert Einstein.

## RESUMO

Durante a infecção malárica, o *Plasmodium* pode provocar elevado estresse oxidativo, resultando em lesões oxidativas, podendo levar ao desenvolvimento de malária grave, como a malária cerebral e a pulmonar. Desse modo, tem se discutido o papel das Espécies Reativas de Oxigênio e das defesas antioxidantes na fisiopatogenia da doença, bem como o potencial benefício da suplementação com antioxidantes. Nesse sentido, duas fontes de antioxidantes são particularmente interessantes: a N-acetilcisteína (NAC) e o cogumelo *Agaricus sylvaticus*. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial benefício da suplementação com N-acetilcisteína e *Agaricus sylvaticus* sobre as alterações oxidativas em modelo experimental de malária causada pelo *Plasmodium berghei*. Para isso, foram utilizados 200 camundongos machos (*Mus musculus*) divididos randomicamente em 20 grupos, como segue: Grupos I-V (controles positivos); VI-X (controles negativos); Grupos XI-XV: (animais infectados e tratados com NAC); Grupos XVI-XX: (animais infectados e tratados com *Agaricus sylvaticus*). As amostras de tecido cerebral e pulmonar e o sangue total foram coletados após 1, 3, 5, 7 e 10 dias de infecção e submetidas a dosagens de malondialdeído (MDA), capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC), nitritos e nitratos (NO) e avaliação do grau de parasitemia. Os resultados mostraram que a parasitemia aumentou progressivamente com a evolução da doença e que houve uma diminuição significativa do 7º ao 10º dia de infecção nos grupos de animais suplementados com ambos os antioxidantes. A capacidade antioxidante total foi maior nos grupos de animais suplementados com os antioxidantes, sendo que os animais tratados com *Agaricus sylvaticus* apresentaram efeito mais pronunciado nas amostras pulmonares, ocorrendo aumento progressivo ao longo dos dias de estudo. Paralelamente, os níveis de MDA pulmonar nos grupos *Agaricus sylvaticus* e NAC mostraram-se semelhante entre si e com o controle positivo. Por outro lado, o MDA cerebral nos grupos suplementados com antioxidantes aumentou durante a infecção, mas não de maneira progressiva. Além disso, nos grupos *Agaricus sylvaticus* os níveis de MDA foram menores do que em NAC, particularmente no 5º dia de infecção. Assim, as lesões oxidativas foram mais pronunciadas no tecido pulmonar do que no cerebral e relacionadas a peroxidação lipídica, no entanto, o *Agaricus sylvaticus* mostrou-se mais efetivo na prevenção da peroxidação lipídica cerebral e pulmonar. Adicionalmente, os níveis de NO pulmonar apresentaram-se elevados nos animais suplementados com NAC em relação ao *Agaricus sylvaticus* do 3º ao 10º dias de estudo, aumentando progressivamente, e os animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* apresentaram níveis de NO semelhantes aos do controle negativo. NAC também induziu a síntese de NO cerebral, mas não ocorreu aumento progressivo. Além disso, os grupos controles positivos e negativos apresentaram níveis de NO cerebral semelhantes. Provavelmente *Agaricus sylvaticus* e NAC atuem por dois mecanismos distintos para tentar debelar a infecção e podem ser úteis na terapia adjuvante da malária.

**Palavras-chave:** *Plasmodium berghei*. Antioxidantes. Estresse oxidativo. *Agaricus sylvaticus*. N-acetilcisteína. Malária.

## ABSTRACT

During malaria infection, *Plasmodium* may provoke high oxidative stress, resulting in oxidative damage, and may lead to the development of severe malaria, such as cerebral and pulmonary malaria. Furthermore, the involvement of reactive oxygen species and antioxidant defenses in the physiopathological phenomena of disease has been discussed, as well as the potential benefit of antioxidant supplements. Hence, from the antioxidant sources that would be suitable, two are particularly interesting: N-acetylcysteine (NAC) and mushroom *Agaricus sylvaticus*. Thus, the aim of this study was to investigate the potential benefit NAC and *Agaricus sylvaticus* supplementation against oxidative changes in murine malaria caused by *Plasmodium berghei*. Two-hundred male mice (*Mus musculus*) were randomly divided into 20 groups, as following: Groups I-V (positive control); Groups VI-X (negative control); Groups XI-XV: (infected and treated with N-acetylcysteine animals); Groups XVI-XX: (infected and treated with *Agaricus sylvaticus* animals). Then, brain, lung, and blood samples were collected after 1, 3, 5, 7, or 10 days after infection for malondialdehyde (MDA), trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), nitrites and nitrates (NO) measurement, and parasitemia rate evaluation. Results show that parasitemia increased progressively with evolution of disease, and that was a significant decrease from 7<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> day of infection in both antioxidant supplemented groups. Total antioxidant capacity was higher in supplemented animal's groups, in that *Agaricus sylvaticus* treated animals presented a most pronounced effect in lung samples, with progressive increase along with the days of infection. At the same time, pulmonary MDA levels in the *Agaricus sylvaticus* and NAC groups showed similar between themselves and with positive control. On the other hand, the cerebral MDA in antioxidants supplemented groups increased during infection, but not in a progressive way. Besides, in the *Agaricus sylvaticus* groups, MDA levels were lower than NAC, particularly in 5<sup>th</sup> day of infection. Thus, oxidative damage were most pronounced in pulmonary tissue than brain and related to lipid peroxidation. However, *Agaricus sylvaticus* was found to be more effective in preventing lipid peroxidation in brain and lung. In addition, pulmonary NO levels were increased in N-acetylcysteine supplemented animals in relationship to *Agaricus sylvaticus* from 3<sup>rd</sup> to 10<sup>th</sup> days of study, progressively increasing, and *Agaricus sylvaticus* supplemented animals presented similar NO levels to negative control groups. NAC also induced cerebral NO synthesis, but not in a progressive way. In addition, positive and negative control groups show similar cerebral NO levels. Probably *Agaricus sylvaticus* and NAC act in two distinct mechanisms in attempt to defeat infection, and can be helpful in the adjuvant therapy of malaria.

**Key words:** *Plasmodium berghei*. Antioxidants. Oxidative stress. *Agaricus sylvaticus*. N-acetylcysteine. Malaria.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Risco de malária por *P. falciparum* definido pela incidência parasitária anual (IPA; SNOW *et al.*, 2008). 24
- Figura 2: Ciclo evolutivo do *Plasmodium*. A) Ciclo esporogônico; B) Ciclo hemático; C) Ciclo Hepático (B e C – Ciclo esquizogônico). 1) Esporozoíto; 2) Merozoítos sanguíneos; 3) Penetração de merozoítas nas hemácias; 4) Esquizonte; 5) Esquizonte maduro; 6) Gametócitos; 7) Gametócitos maduros (microgametócito e macrogametócito); 8) Microgametócito exoflagelado; 9) Oocineto; 10) Oocisto; 11) Esporozoítos (GOBBO, 2010). 29
- Figura 3: Citoaderência e rosetas no endotélio vascular. As hemácias infectadas se ligam ao endotélio vascular e às hemácias não-infectadas. Ambos os fenômenos contribuem para a oclusão do fluxo sanguíneo e consequente gravidade da doença. Os antígenos do parasita podem induzir a liberação de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que estimulam a expressão de receptores (ex. ICAM-1) e distribuição (ex. CD31) no endotélio. ICAM-1 é sugerido como mediador do rolamento das hemácias parasitadas no endotélio, enquanto CD36 e CD31 seriam responsáveis pela maior estabilidade da ligação (CHEN *et al.*, 2000). 31
- Figura 4: Reação de Haber-Weiss. O radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) reage com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), na presença de metais de transição, para produzir radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), íons hidroxila ( $OH^-$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). 35
- Figura 5: Reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é ionizado na presença de íons ferrosos, levando à produção de radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e íons hidroxila ( $OH^-$ ). O íon ferroso ( $Fe^{+2}$ ) sofre oxidação sendo liberado na forma de íon férrico ( $Fe^{+3}$ ). 35
- Figura 6: Representação esquemática da peroxidação lipídica dos ácidos graxos da membrana celular. O radical livre  $^{\bullet}OH$  abstrai um hidrogênio do ácido graxo, dando origem ao radical lipídico. Este, por ser instável, sofre um rearranjo molecular e forma um dieno conjugado, o qual pode reagir com uma molécula de oxigênio e formar um radical peroxila que abstrai um hidrogênio do ácido graxo, dando origem a uma reação em cadeia (Del Maestro, 1980). 39
- Figura 7: Representação esquemática da defasa antioxidante no eritrócito infectado pelo *plasmodium* (BECKER *et al.*, 2004). 43
- Figura 8: Corpo de frutificação (basidiocarpos) de *Agaricus sylvaticus* em dois estágios de maturidade: jovem (YB) e maduro (MB; SOARES *et al.*, 2009). 59
- Figura 9- Acondicionamento dos camundongos *Mus musculus*. 63
- Figura 10- Toracotomia de camundongos *Mus musculus* para a coleta amostra sanguínea. 63

|  |    |
|--|----|
| Figura 11- Punção cardíaca em camundongos <i>Mus musculus</i> para coleta de amostra sanguínea.  | 64 |
| Figura 12- Inoculação intraperitoneal de hemácias infectadas com o <i>P. berghei</i> ANKA em camundongos <i>Mus musculus</i> .   | 65 |
| Figura 13- Disruptor celular ultrassônico para homogeneização das amostras de tecido pulmonar e cerebral.  | 66 |
| Figura14- Esfregaço sanguíneo de camundongos infectados pelo <i>P. berghei</i> corado pelo método de Giemsa, em microscópio óptico com aumento de 1000x.   | 67 |
| Figura 15- Progressão da parasitemia nos camundongos infectados com <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes, comparados ao grupo controle positivo de acordo com o tempo de infecção.  | 70 |
| Figura 16 – Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.   | 71 |
| Figura 17- Comportamento do malondialdeído (MDA) pulmonar dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.  | 73 |
| Figura 18- Comportamento do óxido nítrico (NO) pulmonar dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.  | 75 |
| Figura 19: Correlação entre Malondialdeído (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e <i>Agaricus sylvaticus</i> (e). | 77 |
| Figura 20- Comportamento de Malondialdeído (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.   | 79 |
| Figura 21: Correlação entre Malondialdeído (MDA) e óxido Nítrico (NO) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e <i>Agaricus sylvaticus</i> (e).                                   | 80 |
| Figura 22- Comportamento de Malondialdeído (MDA) e óxido Nítrico (NO) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.   | 82 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 23: Correlação Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e óxido Nítrico (NO) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e <i>Agaricus sylvaticus</i> (e). | 83 |
| Figura 24- Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e óxido Nítrico (NO) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.   | 85 |
| Figura 25: Correlação entre Parasitemia e Malondialdeido (MDA) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e <i>Agaricus sylvaticus</i> (d).   | 86 |
| Figura 26: Comportamento da parasitemia e do Malondialdeido (MDA) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.   | 88 |
| Figura 27: Correlação entre Parasitemia e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e <i>Agaricus sylvaticus</i> (d).  | 89 |
| Figura 28: Comportamento da Parasitemia e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.  | 91 |
| Figura 29: Correlação entre Parasitemia e óxido Nítrico (NO) pulmonar dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e <i>Agaricus sylvaticus</i> (d).  | 92 |
| Figura 30: Valores de Parasitemia e Óxido Nítrico (NO) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.  | 94 |
| Figura 31 – Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.   | 95 |
| Figura 32- Comportamento do Malondialdeido (MDA) cerebral dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.  | 97 |
| Figura 33- Comportamento do óxido Nítrico (NO) cerebral dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.  | 99 |

- Figura 34: Correlação entre Malondialdeído (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e *Agaricus sylvaticus* (e). 101
- Figura 35- Comportamento de Malondialdeído (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção. 103
- Figura 36: Correlação entre Malondialdeído (MDA) e Óxido Nítrico (NO) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e *Agaricus sylvaticus* (e). 104
- Figura 37- Comportamento de Malondialdeído (MDA) e Óxido Nítrico (NO) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção. 106
- Figura 38: Correlação entre Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e Óxido Nítrico (NO) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e *Agaricus sylvaticus* (e). 107
- Figura 39- Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e do Óxido Nítrico (NO) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção. 109
- Figura 40: Correlação entre Parasitemia e Malondialdeído (MDA) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se todos os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e *Agaricus sylvaticus* (d). 110
- Figura 41- Comportamento da Parasitemia e do Malondialdeído (MDA) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção. 111
- Figura 42: Correlação entre Parasitemia e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebrais dos camundongos, considerando-se todos os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e *Agaricus sylvaticus* (d). 112
- Figura 43- Comportamento da Parasitemia e da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção. 113
- Figura 44: Correlação entre Parasitemia e Óxido Nítrico (NO) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e *Agaricus sylvaticus* (d). 114

|  |     |
|--|-----|
| Figura 45- Comporatamento da Parasitemia e do Óxido Nítrico (NO) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.                          | 115 |
| Figura 46: Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle positivo.                            | 116 |
| Figura 47: Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle negativo.                            | 117 |
| Figura 48: Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com N-acetilcisteína.            | 118 |
| Figura 49: Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com <i>Agaricus sylvaticus</i> . | 119 |
| Figura 50: Comportamento do Malondialdeido (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle positivo.  | 120 |
| Figura 51: Comportamento do Malondialdeido (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle negativo.  | 121 |
| Figura 52: Comportamento do Malondialdeido (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com N-acetilcisteína.  | 122 |
| Figura 53: Comportamento do Malondialdeido (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com <i>Agaricus sylvaticus</i> .                                 | 123 |
| Figura 54: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle positivo.  | 124 |
| Figura 55: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle negativo.  | 125 |
| Figura 56: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com N-acetilcisteína.  | 126 |
| Figura 57: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com <i>Agaricus sylvaticus</i> .                                   | 127 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Parasitemia média dos grupos de camundongos infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, em função do tempo de infecção. **70**
- Tabela 2 – Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção. **72**
- Tabela 3- Malondialdeído (MDA) pulmonar e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção. **74**
- Tabela 4 - Óxido Nítrico (NO) pulmonar e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção. **76**
- Tabela 5 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre MDA e TEAC em amostras pulmonares de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes. **78**
- Tabela 6 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre MDA e NO para cada grupo em amostras pulmonares de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes. **81**
- Tabela 7 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre TEAC e NO para cada grupo em amostras pulmonares de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes. **84**
- Tabela 8 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre Parasitemia e MDA para cada grupo nas amostras pulmonares dos camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes. **87**
- Tabela 9 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre Parasitemia e TEAC para cada grupo nas amostras pulmonares dos camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes. **90**
- Tabela 10 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre Parasitemia e NO para cada grupo nas amostras pulmonares dos camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes. **93**
- Tabela 11 – Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção. **96**

|   |            |
|---|------------|
| Tabela 12- Malondialdeído (MDA) cerebral e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção.                     | <b>98</b>  |
| Tabela 13- Óxido Nítrico (NO) cerebral e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção.                       | <b>100</b> |
| Tabela 14 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre MDA e TEAC em amostras cerebrais de camundongos infectados pelo <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.          | <b>102</b> |
| Tabela 15 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre MDA e NO em amostras cerebrais de camundongos infectados pelo <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.            | <b>105</b> |
| Tabela 16 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre TEAC e NO em amostras cerebrais de camundongos infectados pelo <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.           | <b>108</b> |
| Tabela 17 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre Parasitemia e MDA das amostras cerebrais de camundongos infectados pelo <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.  | <b>111</b> |
| Tabela 18 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre Parasitemia e TEAC das amostras cerebrais de camundongos infectados pelo <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes. | <b>113</b> |
| Tabela 19 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre Parasitemia e NO das amostras cerebrais de camundongos infectados pelo <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.   | <b>115</b> |
| Tabela 20: Valores de TEAC e significância estatística no grupo controle positivo para pulmão e cérebro.  | <b>116</b> |
| Tabela 21: Valores de TEAC e significância estatística no grupo controle negativo para pulmão e cérebro.  | <b>117</b> |
| Tabela 22: Valores de TEAC e significância estatística no grupo suplementado com N-acetilcisteína para pulmão e cérebro.  | <b>118</b> |
| Tabela 23: Valores de TEAC e significância estatística no grupo suplementado com <i>Agaricus sylvaticus</i> para pulmão e cérebro.  | <b>119</b> |
| Tabela 24: Valores de MDA e significância estatística no grupo controle positivo para pulmão e cérebro.   | <b>120</b> |

|   |            |
|---|------------|
| Tabela 25: Valores de MDA e significância estatística no grupo controle negativo para pulmão e cérebro.                           | <b>121</b> |
| Tabela 26: Valores de MDA e significância estatística no grupo suplementado com N-acetilcisteína para pulmão e cérebro.           | <b>122</b> |
| Tabela 27: Valores de MDA e significância estatística no grupo suplementado com <i>Agaricus sylvaticus</i> para pulmão e cérebro. | <b>123</b> |
| Tabela 28: Valores de NO e significância estatística no grupo controle positivo para pulmão e cérebro.                            | <b>124</b> |
| Tabela 29: Valores de NO e significância estatística no grupo controle negativo para pulmão e cérebro.                            | <b>125</b> |
| Tabela 30: Valores de NO e significância estatística no grupo suplementado com N-acetilcisteína para pulmão e cérebro.            | <b>126</b> |
| Tabela 31: Valores de NO e significância estatística no grupo suplementado com <i>Agaricus sylvaticus</i> para pulmão e cérebro.  | <b>127</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| ABTS                          | 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio |
| AGP-1                         | Glicoproteína ácida – 1                                       |
| Ang-2                         | Angiopietina-2  |
| ATP                           | Adenosina Trifosfato  |
| BHE                           | Barreira Hemato-Encefálica                                    |
| CM                            | Malária Cerebral  |
| c-NOS                         | Óxido nítrico sintetase constitutiva                          |
| CO                            | Monóxido de Carbono   |
| COHb                          | Carboxihemoglobina  |
| CSA                           | Sulfato de condroitina A                                      |
| DPPH                          | 1,1-difenil-2-picrilidrazila                                  |
| EPO                           | Eritropoietina  |
| Fe <sup>2+</sup>              | Íon ferroso   |
| Fe <sup>3+</sup>              | Íon férrico   |
| FePPIX                        | Ferriprotoporfirina IX  |
| G6PD                          | Glicose-6-fosfato desidrogenase                               |
| GM-CSF                        | Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos    |
| GPIs                          | Glicosilfosfatidilinositóis                                   |
| GSH                           | Glutaciona reduzida   |
| GSH-Px                        | Glutaciona peroxidase   |
| GSSG                          | Glutaciona oxidada  |
| GST                           | Glutaciona-S-transferase                                      |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio  |
| HbO                           | Oxiemoglobina   |
| HO-1                          | Heme oxigenase-1  |
| HOCl                          | Ácido hipocloroso   |
| H <sub>z</sub>                | Hemozoina   |
| ICAM-1                        | Molécula de adesão intercelular-1                             |
| IFN-γ                         | Interferon gama   |
| IgG                           | Imunoglobulina G  |
| IL-8                          | Interleucina-8  |
| IL-10                         | Interleucina-10   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| IL-12                         | Interleucina-12                                     |
| IL-1 $\beta$                  | interleucina-1 $\beta$                              |
| IL-4                          | Interleucina-4                                      |
| i-NOS                         | Óxido Nítrico Sintetase induzível                   |
| IPA                           | Incidência Parasitária Anual                        |
| KAHRP                         | Proteína rica em histidina associada a deformidade  |
| LCR                           | Líquido cefalo-raquidiano                           |
| LDH                           | Lactato desidrogenase                               |
| L-NMMA                        | N-monometil-L-arginina                              |
| LTh                           | Linfócitos T helper                                 |
| MDA                           | Malondialdeído                                      |
| ME                            | Metionina-Encefalina                                |
| MS                            | Ministério da Saúde                                 |
| mRNA                          | Ácido ribonucléico mensageiro                       |
| NAC                           | N-acetilcisteína                                    |
| NADPH                         | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida |
| NF- $\kappa$ B                | Fator Nuclear kappa B                               |
| NO                            | Óxido Nítrico                                       |
| NO <sub>2</sub> <sup>•-</sup> | Íon nitrito   |
| NO <sub>3</sub> <sup>•-</sup> | Íon nitrato   |
| NOS                           | Óxido Nítrico Sintetase                             |
| NOS-1                         | Óxido Nítrico Sintetase Neuronal                    |
| NOS-2                         | Óxido Nítrico Sintetase Inflamatória                |
| NOS-3                         | Óxido Nítrico Sintetase Endotelial                  |
| NK                            | Células <i>natutal Killer</i>                       |
| <sup>•</sup> O <sub>2</sub>   | Radical superóxido                                  |
| OH <sup>•</sup>               | Radical hidroxila                                   |
| OH <sup>-</sup>               | Íons hidroxila                                      |
| OMS                           | Organização mundial de saúde                        |
| ONOO <sup>•-</sup>            | Peroxinitrito                                       |
| OPAS                          | Organização Pan-Americana de Saúde                  |
| PBMC                          | Células Mononucleares do Sangue Periférico          |
| PECAM                         | Molécula de adesão da célula endotelial à plaqueta  |

|                |  |
|----------------|--|
| PfEMP1         | Proteína 1 de membrana eritrocitária de <i>P. falciparum</i> |
| PfEMP3         | Proteína 3 de membrana eritrocitária de <i>P. falciparum</i> |
| PfHRP2         | Proteína 2 rica em histidina do <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PHA            | Fitohemaglutinina  |
| PUFA           | Ácido graxo poli-insaturado                                  |
| R <sup>•</sup> | Radicais alquila   |
| RNS            | Espécies Reativas de Nitrogênio                              |
| ROS            | Espécies Reativas de Oxigênio                                |
| SOD            | Superóxido dismutase   |
| TBA            | Ácido Tiobarbitúrico   |
| TBARS          | Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico                   |
| TEAC           | Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox                |
| t-BHP          | Hidroperóxido t-butil  |
| Th1            | Resposta celular do tipo 1                                   |
| Th2            | Resposta celular do tipo 2                                   |
| TLR-4          | Receptor <i>Toll like-4</i>                                  |
| TNF- $\alpha$  | Fator de necrose tumoral - $\alpha$                          |
| TROLOX         | Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico      |
| Trx            | Tioredoxina  |
| TrxR           | Tioredoxina redutase   |
| UV             | Radiação Ultravioleta  |
| VCAM           | Molécula de adesão à célula vascular                         |
| VEGF           | Fator de crescimento endotelial vascular                     |
| $\alpha$ -TTP  | Proteína de transferência de $\alpha$ -tocoferol             |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1- INTRODUÇÃO</b>   | <b>23</b> |
| 1.1- MALÁRIA   | 23        |
| <b>1.1.1- Características Biológicas e Ciclo Evolutivo do <i>Plasmodium</i></b>                | <b>27</b> |
| <b>1.1.2- Patogênese da Malária</b>  | <b>30</b> |
| 1.2- RADICAIS LIVRES E O ESTRESSE OXIDATIVO  | 34        |
| <b>1.2.1 - O Estresse Oxidativo na Malária</b>   | <b>36</b> |
| <b>1.2.2 - Peroxidação Lipídica e Hemólise em Eritrócitos Infectados</b>                       | <b>38</b> |
| 1.3- A DEFESA ANTIOXIDANTE FISIOLÓGICA   | 41        |
| <b>1.3.1 - Mecanismos de Defesa Antioxidante Envolvidos na Infecção pelo <i>Plasmodium</i></b> | <b>42</b> |
| <b>1.3.2 - Mecanismos de Defesa Pró-Oxidante Envolvidos na Infecção pelo <i>Plasmodium</i></b> | <b>45</b> |
| <b>1.3.3 - A Defesa Antioxidante do <i>Plasmodium</i></b>                                      | <b>46</b> |
| <b>2- REVISÃO DA LITERATURA</b>  | <b>48</b> |
| 2.1 - RESPOSTA IMUNE E PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA MALÁRIA                                       | 48        |
| 2.2- EVIDÊNCIAS DAS ALTERAÇÕES DA DEFESA ANTIOXIDANTE EM PORTADORES DA MALÁRIA                 | 50        |
| <b>2.2.1- Em Modelos Experimentais da Malária</b>  | <b>50</b> |
| <b>2.2.2- Em Pesquisas Clínicas da Malária</b>   | <b>51</b> |
| 2.3 - ESTUDOS DE INTERVENÇÕES COM ANTIOXIDANTES  | 54        |
| <b>2.3.1- Em Modelos Experimentais</b>   | <b>54</b> |
| <b>2.3.2- Em Pesquisas Clínicas</b>  | <b>55</b> |
| 2.4 - POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA N-ACETILCISTEINA   | 56        |
| 2.5 - POTENCIAL ANTIOXIDANTE E MEDICINAL DO COGUMELO <i>Agaricus sylvaticus</i>                | 58        |
| <b>3 - OBJETIVOS</b>   | <b>61</b> |
| 3.1 - GERAL  | 61        |
| 3.2 - ESPECÍFICOS  | 61        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4 – METODOLOGIA</b>   | <b>62</b>  |
| 4.1- INDUÇÃO DA MALÁRIA NOS ANIMAIS                                | 64         |
| 4.2 - HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS                                   | 65         |
| 4.3 - DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA                                  | 66         |
| 4.4- PROCEDIMENTO TÉCNICO  | 67         |
| <b>4.4.1- Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TEAC)</b> | <b>67</b>  |
| <b>4.4.2 - Dosagem do Malondialdeído (MDA)</b>                     | <b>68</b>  |
| <b>4.4.3- Determinação do Óxido Nítrico (NO)</b>                   | <b>68</b>  |
| 4.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA   | 69         |
| <b>5- RESULTADOS</b>   | <b>70</b>  |
| 5.1- PARASITEMIA   | 70         |
| 5.2- DOSAGENS PULMONARES   | 71         |
| <b>5.2.1- Perfil do TEAC</b>                                       | <b>71</b>  |
| <b>5.2.2- Perfil do MDA</b>  | <b>73</b>  |
| <b>5.2.3- Perfil do NO</b>   | <b>75</b>  |
| <b>5.2.4- Estudo de Correlação em Amostras Pulmonares</b>          | <b>77</b>  |
| 5.2.4.1- Correlação entre MDA e TEAC                               | 77         |
| 5.2.4.2- Correlação entre MDA e NO                                 | 80         |
| 5.2.4.3- Correlação entre TEAC e NO                                | 83         |
| 5.2.4.4- Correlação entre Parasitemia e MDA                        | 86         |
| 5.2.4.5- Correlação entre Parasitemia e TEAC                       | 89         |
| 5.2.4.6- Correlação entre Parasitemia e NO                         | 92         |
| 5.3- DOSAGENS CEREBRAIS  | 95         |
| <b>5.3.1- Perfil do TEAC</b>                                       | <b>95</b>  |
| <b>5.3.2- Perfil do MDA</b>  | <b>97</b>  |
| <b>5.3.3- Perfil do NO</b>   | <b>99</b>  |
| <b>5.3.4- Estudo de Correlação em amostras Cerebrais</b>           | <b>101</b> |
| 5.3.4.1- Correlação entre MDA e TEAC                               | 101        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.3.4.2- Correlação entre MDA e NO   | 104        |
| 5.3.4.3- Correlação entre TEAC e NO  | 107        |
| 5.3.4.4- Correlação entre Parasitemia e MDA                                    | 110        |
| 5.3.4.5- Correlação entre Parasitemia e TEAC                                   | 112        |
| 5.3.4.6- Correlação entre Parasitemia e NO                                     | 114        |
| <b>5.3.5 – Correlação entre Pulmão e Cérebro</b>                               | <b>116</b> |
| 5.3.5.1- Correlação entre TEAC Pulmonar e Cerebral                             | 116        |
| 5.3.5.2- Correlação entre MDA Pulmonar e Cerebral                              | 120        |
| 5.3.5.3- Correlação entre NO Pulmonar e Cerebral                               | 124        |
| <b>6- DISCUSSÃO</b>  | <b>128</b> |
| 6.1- COMPORTAMENTO OXIDATIVO PULMONAR  | 130        |
| <b>6.1.1- Correlação Pulmonar e a Suplementação com Antioxidantes</b>          | <b>136</b> |
| 6.2- COMPORTAMENTO OXIDATIVO CEREBRAL  | 139        |
| <b>6.2.1- Correlação Cerebral e a Suplementação com Antioxidantes</b>          | <b>147</b> |
| 6.3- ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS COMPORTAMENTOS OXIDATIVOS PULMONAR E CEREBRAL | 149        |
| 6.4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS   | 152        |
| <b>7- CONCLUSÕES</b>   | <b>153</b> |
| <b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>154</b> |
| <b>9- APÊNDICES</b>  | <b>175</b> |
| <b>10- ANEXOS</b>  | <b>195</b> |

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 – MALÁRIA

A malária é uma das infecções humanas mais prevalentes e um enorme problema de saúde, econômico e social para mais de 40% da população mundial, correspondendo a 105 países (SUH *et al.*, 2004; POTTER *et al.*, 2005). Estima-se que a cada ano deva ocorrer cerca de 300 a 500 milhões de novos casos, resultando em 1,5 a 2,7 milhões de mortes, das quais 90% ocorrem na África Subsaariana, envolvendo principalmente crianças abaixo de cinco anos de idade (SUH *et al.*, 2004; CARBALLEIRA, 2008; REIS *et al.*, 2010). Dois terços do restante estão concentrados em países como Índia, Brasil, Sri Lanka, Afeganistão, Vietnã e Colômbia (LOU *et al.*, 2001).

As principais espécies de *Plasmodium* capazes de causar malária em humanos são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* (SUH *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2004). No entanto, recentemente em estudos realizados com pacientes na Malásia, foi identificado que o *P. Knowlesi*, que infecta símios, pode transmitir um tipo específico de malária em humanos (COX-SINGH *et al.*, 2008; COX-SINGH e SINGH, 2008). A infecção causada pelo *P. falciparum*, responsável pelas formas mais graves da doença e por quase todos os casos de morte, tem sido bem caracterizada em áreas de alta endemicidade na África (FERREIRA *et al.*, 2004; JAMARILLO *et al.*, 2005; HOGG *et al.*, 2006). No entanto, é de difícil controle, devido à complexidade do parasita, que têm a capacidade de invadir diferentes alvos celulares, tanto no hospedeiro vertebrado quanto no mosquito vetor e utilizar diferentes mecanismos de invasão envolvendo um grande número de proteínas (GARCIA *et al.*, 2006).

Ao mesmo tempo, pouco se sabe sobre a aquisição de imunidade ao *Plasmodium vivax*, responsável por 70 a 80 milhões de infecções por ano na Ásia, Oceania e África do Sul (MENDIS *et al.*, 2001). As infecções assintomáticas pelo *P. vivax*, ocorrem anos após a exposição contínua a esta espécie (ALVES *et al.*, 2002; ROSHANRAVAN *et al.*, 2003). Além disso, a co-circulação de mais de uma espécie de plasmódio, como *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* é uma característica comum da maioria das áreas onde a malária é endêmica, aumentando a prevalência e criando padrões complexos de interações inter-espécies (FERREIRA *et al.*, 2004).

Por outro lado, as infecções causadas por *P. ovale* e *P. malariae* são relativamente raras (SUH *et al.*, 2004).

Nas Américas Central e do Sul, a transmissão ocorre em 21 países, onde o *Plasmodium vivax* é o principal causador da doença, correspondendo a 77% dos casos, seguido pelo *P. falcifarum* com 25,6% dos casos. No entanto, existem países como Haiti e República Dominicana onde o *P. falciparum* é responsável por 100% dos casos de malária (WHO, 2009). A figura 1 mostra o risco de malária por *Plasmodium falciparum* definido pela Incidência Parasitária Anual (IPA).

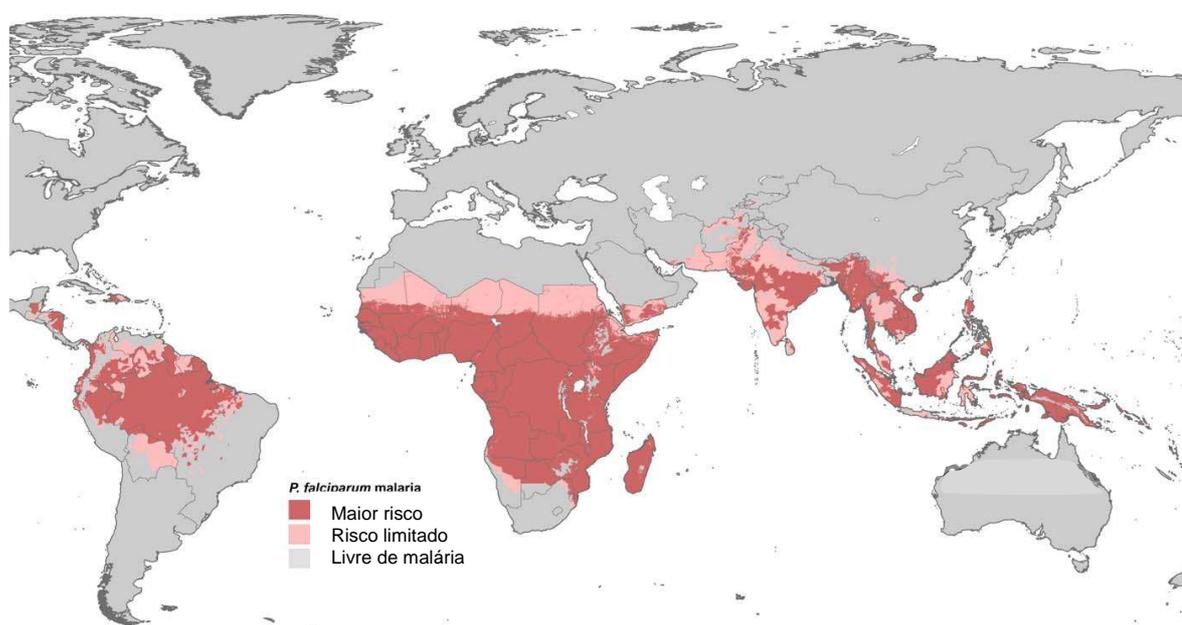


Figura 1: Risco de malária por *P. falciparum* definido pela incidência parasitária anual (IPA; SNOW *et al.*, 2008).

No Brasil, a transmissão ocorre por três espécies de plasmódios: *Plasmodium vivax*, *P. facifarum* e *P. malariae*, sendo a primeira a espécie predominante no país (BRASIL, 2008). Nos anos de 2003 a 2005, observou-se nova elevação progressiva no número de casos da doença, chegando a 607.730 notificados em 2005, um aumento de 74% em relação a 2002. No entanto, de acordo com o Ministério da Saúde (MS) vem ocorrendo uma queda significativa no número de casos de malária nos últimos anos. De 2006 a 2008, foi observado declínio constante no número de casos, passando de 550.930 para 313.922, uma redução de 43%.

A região da Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão, compreende aproximadamente 99,5% dos casos da doença registrados no Brasil. O estado do Pará, composto por 143 municípios, é classificado como uma área de baixo risco para a doença, de acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA < 10/1.000 hab.). Este parâmetro classifica as áreas de transmissão em alto, médio e baixo risco, de acordo com o número de casos por mil habitantes (Fig.1). De acordo com o MS houve uma redução de 16,43% no ano de 2008 em relação a 2007, quando foram registrados 71.119 casos de malária e IPA= 9,8/1.000 hab. Entretanto, há regiões do Estado nas quais a situação da doença é preocupante, tais como no município de Tucuruí, que registrou 3.450 casos da doença em 2007, sendo classificado como área de médio risco para a malária (IPA = 38,5/1000 hab.; (BRASIL, 2008) e Oeiras do Pará, que registrou 3.281 casos de janeiro a junho de 2010 (BRASIL, 2010).

De fato, o alto índice e a gravidade da doença estão relacionados, em grande parte, às alterações oxidativas causadas durante a infecção pelo *Plasmodium*. Assim, o parasita pode afetar hemácias infectadas e não infectadas do hospedeiro, as quais podem exibir muitas características de senescência, que é resultado da agressão oxidativa e desequilíbrio da defesa antioxidante, podendo contribuir para a anemia malárica e às formas graves da doença (OMODEO-SALÈ *et al.*, 2003; TANNEUR *et al.*, 2005).

Durante o desenvolvimento intra-eritrocítico do parasita, cerca de 80% das moléculas de hemoglobina são degradadas como fonte de aminoácidos, resultando na liberação de grande quantidade de heme livre (Ferriprotoporfirina IX) e radicais livres (MASHIMA *et al.*, 2002). Por possuir grupos  $Fe^{2+}$  associados, estes grupos heme são capazes de induzir o estresse oxidativo intravascular, causando alterações nos eritrócitos e nas células endoteliais, favorecendo a internalização do parasita nos tecidos, como o fígado e o cérebro (JARAMILLO *et al.*, 2005).

Assim, quando os mecanismos de proteção antioxidante tornam-se desequilibrados, alterações fisiológicas devem ocorrer, resultando em doenças e aceleração do envelhecimento. No entanto, suplementos antioxidantes ou alimentos que contêm antioxidantes podem ser usados para ajudar a reduzir os danos oxidativo em humanos (MAU *et al.*, 2001). Neste sentido, tem se discutido o papel dos radicais livres e de antioxidantes na fisiopatogenia da malária, os quais podem

fornecer proteção contra o estresse oxidativo induzido pela doença (METZGER *et al.*, 2001), bem como a administração de antioxidantes pode diminuir as alterações oxidativas provenientes da infecção (GENNARI *et al.*, 2004; JAMARILLO *et al.*, 2005).

O papel dos antioxidantes e do estresse oxidativo na patogênese da malária em humanos não são bem compreendidos. Em modelos murinos, a administração de moléculas pró-oxidantes como óleo de peixe e da semente de linhaça protegeu os animais do desenvolvimento da malária cerebral, especialmente em situação de deficiência de vitamina E. Assim, tem sido argumentado que a deficiência de vitamina E pode ter efeito protetor contra o desenvolvimento de malária cerebral em roedores, mas esta relação em humanos não é bem compreendida (METZGER *et al.*, 2001; HERBAS *et al.*, 2010). Por outro lado, tem se discutido que antioxidantes, tais como carotenóides ou vitamina E poderiam fornecer proteção contra o estresse oxidativo induzido pela infecção do *Plasmodium*, modulando a resposta imune (METZGER *et al.*, 2001). Não obstante, a N-acetilcisteína (NAC) tem ação inibitória sobre a citoaderência nas células que expressão CD36 e na dissolução de agregados pré-formados nas hemácias infectadas pelo *P. falciparum* (WATT *et al.*, 2002).

Adicionalmente, na malária murina causada pelo *P. berghei*, a administração do antioxidante  $\alpha$ -tocoferol previniu a morte por complicações cerebrais através da inibição das caspases, sugerindo que a inibição da apoptose possa ser viável *in vivo*. A apoptose é a morte celular programada e está intimamente relacionada a fisiologia e a patologia de vários sistemas celulares (CANDE, *et al.*, 2002). De fato, o metabolismo redox alterado das células do hospedeiro, particularmente as células endoteliais, pode agravar as complicações da malária, por exemplo, pelo aumento das lesões endoteliais, inflamação e levando ao desenvolvimento da malária cerebral (KAVISHE *et al.*, 2006), de forma que os antioxidantes e os inibidores das proteases podem oferecer benefício clínico através da prevenção das complicações orgânicas devido à apoptose endotelial, mesmo que não possam acelerar o *clearance* do parasita (HEMMER *et al.*, 2005).

Portanto, é possível que a suplementação prévia com fontes ricas em antioxidantes possa exercer papel preventivo ao desenvolvimento da doença e se constituir em estratégia de proteção a indivíduos que se exponham ao parasita, principalmente nas áreas endêmicas. Assim, dentre as fontes de antioxidantes que

poderiam exercer este papel, duas são particularmente interessantes: a N-acetilcisteína, que é precursora da síntese hepática da glutatona (SCARDOELI, 1996) e os cogumelos do gênero *Agaricus*, recentemente identificados como portadores de elevada capacidade antioxidante total (LIU *et al.*, 1997; GENNARI *et al.*, 2004; PERCÁRIO *et al.*, 2009).

Nesse sentido, o uso de substâncias antioxidantes poderá restabelecer o equilíbrio redox, com conseqüente diminuição das alterações oxidativas nas hemácias, aumentando a sobrevivência dos animais, associada a um aumento da capacidade antioxidante total e diminuição dos níveis dos marcadores do estresse oxidativo, dificultando o estabelecimento da doença. Não obstante, é possível que a suplementação nutricional com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* seja mais pronunciada em relação à suplementação com N-acetilcisteína, em função de sua elevada capacidade antioxidante total.

### **1.1.1 - Características Biológicas e Ciclo Evolutivo do *Plasmodium***

O *Plasmodium* spp. pertence ao filo Apicomplexa, que inclui patógenos intracelulares, tais como os gêneros *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Babesia* e *Theileria*. Todos os Apicomplexa são parasitas intracelulares, com crescimento e replicação no vacúolo parasitóforo não-fagossomal, que é um compartimento ligado à membrana. O filo Apicomplexa tem uma estrutura característica, chamada de apicoplasto (similar ao cloroplasto), que é essencial à sua sobrevivência, uma vez que sintetiza o ácido lipóico que é um potente antioxidante usado pelo parasita (MORRISSETTE *et al.*, 2002; TOLER, 2005; KEHR *et al.*, 2010).

O ciclo de vida do gênero *plasmodium* é complexo, com o parasita alternando entre a reprodução sexuada no hospedeiro invertebrado (mosquito) e a reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado (SCHUSTER, 2002), compreendendo estágios distintos morfológica e antigenicamente (FERREIRA *et al.* 2004).

O início do ciclo evolutivo do parasita no hospedeiro humano começa com a picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado, cujos representantes de importância no Brasil são o *A. darlingi*, *A. aquasalis* e *A. albicans* (BRASIL, 2009). Assim, cerca de 20 a 200 esporozoítos são inoculados sob a pele,

permanecendo ali por um curto período, possivelmente permeando a epiderme para adentrar à corrente sanguínea (GARCIA *et al.*, 2006).

Uma vez que os esporozoítos atingem a corrente sanguínea, são transportados via artéria hepática ou veia porta aos sinusóides hepáticos, que são constituídos de células endoteliais altamente fenestradas e invadem células hepáticas, iniciando o ciclo hepático (ou pré-eritrocítico). A retenção dos esporozoítos nos sinusóides hepáticos provavelmente é mediada pelas proteínas do circunsporozoito e proteína adesiva relacionada à trombospondina, que são as principais proteínas de superfície do esporozoíto. A migração dos esporozoítos aos hepatócitos infectados leva ao desenvolvimento intracelular de trofozoítos pré-eritrocíticos que, por esquizogonia, dão origem aos merozoítos, capazes de infectar eritrócitos (Fig. 2; FREVERT *et al.*, 2005).

Das espécies de parasitas humanos da malária, *P. vivax* e *P. ovale*, apresentam células latentes no fígado, denominadas de hipnozoítos, que sobrevivem no parênquima hepático do hospedeiro e são fontes de recidivas que ocorrem semanas ou meses após a infecção primária (SCHUSTER, 2002; FERREIRA *et al.* 2004).

O ciclo eritrocítico do *plasmodium* começa com o reconhecimento, ligação e invasão das hemácias pelos merozoítos cerca de 1 a 2 minutos depois de serem liberados. Depois que os eritrócitos são invadidos, os parasitas se encontram no interior do vacúolo parasitóforo. Nas próximas 48 ou 72 horas, os parasitas seguem vários estágios de desenvolvimento intra-eritrocítico (trofozoíto jovem, trofozoíto maduro e esquizonte) até que os novos merozoítos são finalmente desenvolvidos, e liberados pela ruptura de eritrócitos, passando a infectar novos eritrócitos (GARCIA *et al.*, 2006).

Quando as hemácias infectadas se rompem, cada esquizonte maduro libera cerca de 8 a 32 merozoítos e cada um invade um novo eritrócito. A febre paroxística (acesso malárico), uma característica da malária, ocorre quando as hemácias infectadas se rompem e liberam moléculas derivadas da atividade do parasita, conhecidas como hemozoína, que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo hospedeiro. Depois de poucos ciclos, alguns merozoítos se desenvolvem a estágios sexuais, conhecidos como gametócitos (gametas masculino e feminino), que podem ser ingeridos pelo mosquito vetor no momento do repasto de sangue humano infectado (Fig.2; GARCIA *et al.*, 2006).

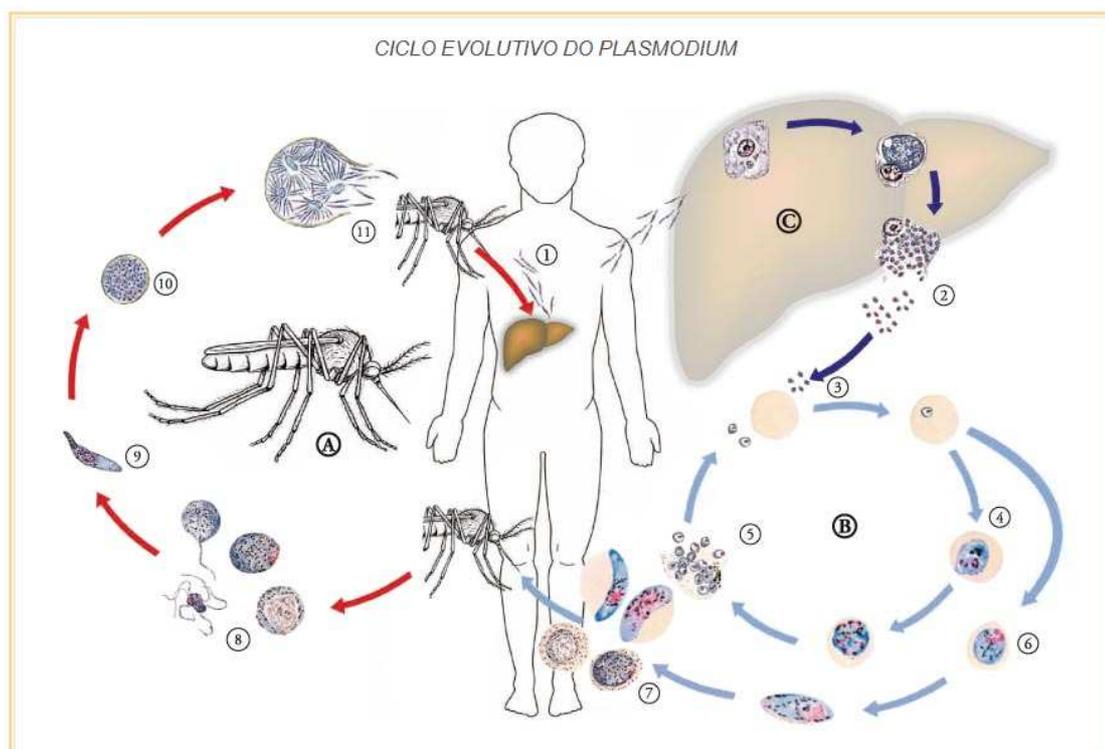


Figura 2: Ciclo evolutivo do *Plasmodium*. A) Ciclo esporogônico; B) Ciclo eritrocítico; C) Ciclo Hepático (B e C – Ciclo esquizogônico). 1) Esporozoíto; 2) Merozoítos sanguíneos; 3) Penetração de merozoítos nas hemácias; 4) Esquizonte; 5) Esquizonte maduro; 6) Gametócitos; 7) Gametócitos maduros (microgametócito e macrogametócito); 8) Microgametócito exoflagelado; 9) Oocineto; 10) Oocisto; 11) Esporozoítos (GOBBO, 2010).

Após a ingestão de sangue infectado pelo mosquito *Anopheles*, os microgametas (masculino) e macrogametas (feminino) alcançam o intestino do mosquito, onde os microgametas penetram nos macrogametas, formando os zigotos que se transformam em oocinetos, os quais podem invadir as células epiteliais do intestino do mosquito (KAPPE *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2006), adquirem uma forma trófica chamada oocisto que amadurece e forma centenas de esporozoítos que são liberados durante a sua ruptura (FERREIRA *et al.*, 2004). Uma vez que os esporozoítos passam pela lâmina basal, chegando às glândulas salivares, podem infectar outro hospedeiro (BATON *et al.*, 2005).

### 1.1.2- Patogênese da Malária

A patogênese da malária é melhor compreendida na infecção pelo *P. falciparum*, onde vários fatores contribuem para a gravidade da doença. Altas cargas parasitárias combinadas com a habilidade de infectar eritrócitos, que podem aderir ao endotélio do hospedeiro, contribuem para a oclusão vascular, desregulação metabólica e acidose, levando às manifestações da malária grave, tais como, síndrome da angústia respiratória aguda, insuficiência renal, malária cerebral e pulmonar. Além disso, uma forte resposta das citocinas às proteínas do parasita, liberadas durante a ruptura dos esquizontes, pode contribuir para as consequências clínicas adversas (COOKE *et al.*, 2000).

As manifestações clínicas da malária grave podem incluir convulsões, falência renal aguda, choque hemodinâmico, acidose metabólica e anemia severa, dependendo também de fatores relacionados ao hospedeiro, tais como a existência de doença falciforme e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que podem modificar a susceptibilidade à doença (DAY e DONDORP, 2007).

As hemácias infectadas com trofozoítos de *P. falciparum* jovens circulam no sangue periférico, enquanto que quase todas as hemácias que contém trofozoítos maduros e esquizontes são sequestradas nos vasos capilares de diferentes órgãos, o que evita a sua remoção pelo baço. Paralelamente, uma grande quantidade de variações antigênicas codificadas na superfície do parasita foram encontradas e relacionadas à ligação das hemácias infectadas com o parasita maduro aos receptores endoteliais (FERREIRA *et al.*, 2004).

A principal adesina derivada do parasita é a Proteína 1 de membrana eritrocitária de *P. falciparum* (PfEMP1; BECKER *et al.*, 2004). Nos últimos anos, a PfEMP1 tem sido associada ao fenômeno da citoaderência e interação com um grande número de receptores endoteliais, tais como CD36, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), sulfato de condroitina A (CSA), molécula de adesão da célula endotelial à plaqueta (PECAM), molécula de adesão à célula vascular (VCAM), ácido hialurônico, sulfato de heparina, imunoglobulina G (IgG) e antígenos dos grupos sanguíneos ABO. Assim, acredita-se que a aderência das hemácias infectadas aos receptores endoteliais esteja casualmente associada à doença grave (Figura 3; FERREIRA *et al.*, 2004; PHIRI *et al.*, 2009). A figura 3 mostra o fenômeno da citoaderência envolvido nos casos de malária grave.

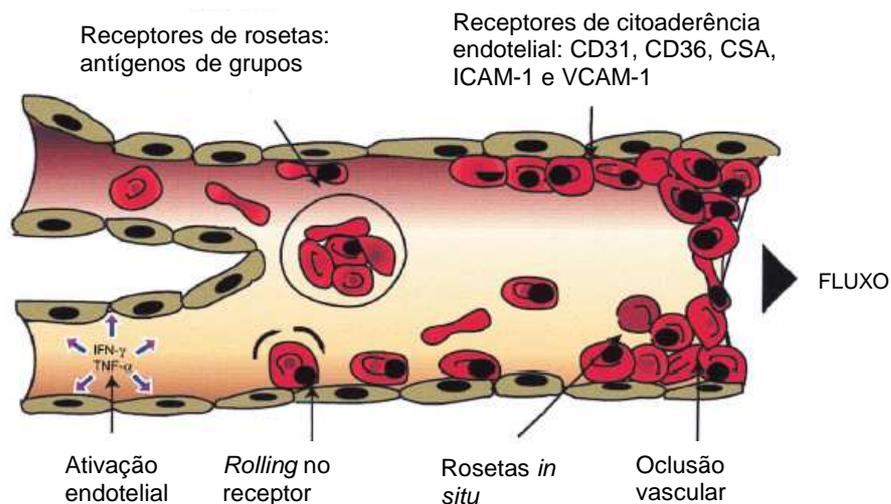


Figura 3: Citoaderência e rosetas no endotélio vascular. As hemácias infectadas se ligam ao endotélio vascular e às hemácias não-infectadas. Ambos os fenômenos contribuem para a oclusão do fluxo sanguíneo e conseqüente gravidade da doença. Os antígenos do parasita podem induzir a liberação de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que estimulam a expressão de receptores (ex. ICAM-1) e distribuição (ex. CD31) no endotélio. ICAM-1 é sugerido como mediador do rolamento das hemácias parasitadas no endotélio, enquanto CD36 e CD31 seriam responsáveis pela maior estabilidade da ligação (CHEN *et al.*, 2000).

A malária grave, como é definida pela organização mundial de saúde (OMS), refere-se ao quadro clínico apresentado por uma pessoa parasitada pelo *P. falciparum* com uma ou mais das seguintes características: prostração, alterações da consciência, angústia respiratória ou edema pulmonar, colapso circulatório, sangramento anormal, icterícia, hemoglobinúria ou anemia severa (hemoglobina < 50 g/L ou hematócrito < 15%). A prostração e alterações da consciência ocorrem frequentemente tanto em crianças como em adultos na doença grave; o distúrbio respiratório e anemia grave são mais comuns em crianças, enquanto que a falência renal e icterícia ocorrem com maior frequência nos adultos. A síndrome da angústia respiratória, normalmente ocorre durante o segundo ao quarto dia de tratamento, mesmo quando a parasitemia diminui (SUH *et al.*, 2004).

A malária grave usualmente ocorre com parasitemia de 5% ou mais e, mesmo com um bom acompanhamento, a taxa de mortalidade ultrapassa 20%. Os grupos de alto risco de desenvolver malária grave são pessoas imunodeficientes, crianças e mulheres grávidas, que vivem em áreas endêmicas. As complicações geralmente envolvem o sistema nervoso central, e os sistemas hematopoiético, renal e pulmonar. Além disso, anemia severa, falência renal aguda, hemólise intravascular e coagulopatias podem ser desenvolvidas (SUH *et al.*, 2004).

Nesse sentido, dentre as complicações graves causadas pelo *P. falciparum*, destacam-se o comprometimento pulmonar, caracterizado principalmente pela presença de edema pulmonar agudo, e a malária cerebral (CM), que é a manifestação mais grave da malária falciparum, caracterizada por forte cefaléia, hipertermia, vômitos, sonolência e convulsões (principalmente em crianças; BOULOS *et al.*, 1993; PENET *et al.*, 2007).

Em relação a malária pulmonar, estudos experimentais com camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* mostraram as seguintes alterações: (a) aumento da complacência pulmonar; (b) aumento da resistência pulmonar; (c) aumento do volume respiratório; (d) aumento da capacidade residual funcional; (e) rompimento do septo alveolar e aumento do espaço pneumático, como revelado por exame histológico. As últimas mudanças (d, e) indicam lesões enfisematosas que podem referir-se a dificuldades respiratórias e à acidose, aparecendo imediatamente antes da morte dos animais parasitados (SADAVONGVIVAD *et al.*, 1969).

A participação do pulmão como um dos principais órgãos envolvidos na gravidade da malária já vem sendo discutido a bastante tempo (BOULOS *et al.*, 1993; TAYLOR *et al.*, 2006; ROJO-MARCOS *et al.*, 2008), mas o conhecimento sobre essa patogênese ainda é limitado, apesar de ser caracterizada clinicamente como grave e frequentemente letal. Sabe-se que o quadro clínico inicial é de síndrome da angústia respiratória aguda, acompanhado, nas formas mais severas da doença, de edema pulmonar. Os mecanismos responsáveis por desencadear esta complicação, parecem preceder do aumento da permeabilidade dos capilares alveolares, levando ao acúmulo de líquido nos pulmões (TAYLOR *et al.*, 2006).

Algumas teorias buscam encontrar a real causa desta complicação. Alguns pesquisadores mostram que o edema pulmonar é resultante do choque séptico, oriundo de uma co-infecção bacteriana (GACHOT *et al.*, 1995; TAYLOR *et al.*, 2006); outros, que substâncias oriundas da infecção parasitária, tais como: glicofosfatidilinositois (GPIs) - moléculas ancoradas às proteínas de membrana do eritrócito parasitado que apresentam tal proteína às células do hospedeiro - e vacúolos digestivos podem contribuir para as alterações vasculares que levam a malária pulmonar (GILLRIE *et al.*, 2007). Outros pesquisadores acreditam que esses acometimentos severos sejam oriundos do fenômeno de citoaderência, particularmente peculiar ao *P. falciparum*, sendo que, nesse caso, é perfeitamente

possível a ocorrência de processos de isquemia e reperfusão (POUELLE *et al.*, 2007; PHIRI *et al.*, 2009).

As alterações pulmonares decorrentes da infecção pelo *Plasmodium falciparum* incidem em 3 a 10% dos casos, apresentando manifestações clínicas variáveis, desde discretas, relacionadas às vias aéreas superiores, até complicações mais graves com hipóxia severa, edema pulmonar e morte. O edema pulmonar agudo desenvolve-se em aproximadamente 1/3 dos casos fatais de malária falciparum entre adultos, com letalidade próxima a 70% (BOULOS *et al.*, 1993).

Em crianças, o distúrbio respiratório é uma resposta a acidose metabólica, predominantemente devido ao aumento da produção do ácido láctico. Assim, a obstrução microvascular na presença de anemia pode exacerbar a acidose láctica. Além disso, eritrócitos rígidos podem exacerbar esta obstrução microvascular e prejudicar o fluxo sanguíneo, levando a malária grave na fase aguda da doença (DAY e DONDORP, 2007).

A combinação genômica dos parasitas da malária de roedores e das regiões cromossômicas centrais que são ortólogas ao *P. falciparum* são representativas. Assim, o uso de *P. berghei* e *P. yoelii* (espécies que causam malária murina) como modelos geneticamente tratáveis para a análise de vários aspectos de transmissão, fazem deles os principais parasitas utilizados para o estudo experimental de malária (KHAN e WATERS, 2004). Mais especificamente, da mesma forma que o *P. falciparum*, o *P. berghei* ANKA possui a habilidade de sequestrar-se na microvasculatura, de forma que a infecção resulta em morte para 100% dos animais, sendo o parasita de escolha para estudos *in vivo* de malária cerebral experimental (OAKLEY *et al.*, 2008).

Relatos mostram que a CM ocorre em mais de 10% de todos os casos de malária por *Plasmodium falciparum* em pessoas hospitalizadas e, destes, 80% são fatais (LOU *et al.*, 2001). Por isso, várias observações de estudos de CM experimental tem sido extendidas e confirmadas em doenças humanas. Primeiro, a alta produção de citocinas foi detectada durante a CM experimental, contribuindo para a patologia vascular cerebral. O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) mostraram ser importantes mediadores na patogênese da malária. Segundo, linfócitos T helper (LTh) desempenham um papel significativo no desenvolvimento da CM murina. Em resposta ao parasita, o hospedeiro elabora uma resposta celular do tipo 1 (Th1) maior do que a resposta celular tipo 2 (Th2).

Terceiro, as mudanças fenotípicas induzidas pelas citocinas das células endoteliais microvasculares cerebrais representam um evento chave no sequestro das hemácias parasitadas (LOU *et al.*, 2001).

De fato, as células vasculares endoteliais desempenham um papel fundamental na patogênese da infecção malárica, especialmente na citoaderência dos eritrócitos infectados às células endoteliais. A expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais é parcialmente regulada por radicais livres e lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL oxidada). O estresse oxidativo deve regular as funções do endotélio vascular via radicais livres ou produtos bioativos de peroxidação lipídica. Isto pode resultar em alterações nos níveis de expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial e, assim, aumentar a citoaderência dos eritrócitos infectados (SIBMOOH *et al.*, 2004).

No cérebro, o sequestro de hemácias ocorre em regiões de alta densidade na microvasculatura. Portanto, é provável que ocorra hipóxia local no sequestro do parasita, com reoxigenação na ruptura de esquizontes liberando seu conteúdo. Assim, a síndrome de isquemia e reperfusão é uma grande causa de lesões neurológicas na CM. Além disso, radicais livres, citocinas e aminoácidos excitatórios podem contribuir para as lesões neurológicas (BECKER *et al.*, 2004).

## 1.2 – OS RADICAIS LIVRES E O ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres são partículas (átomos ou moléculas) que apresentam vida livre e número ímpar de elétrons na camada de valência, ou seja, são espécies químicas reativas que possuem elétrons não pareados nos orbitais mais externos. Decorrem da definição química, duas propriedades peculiares: alta reatividade e alta instabilidade. Estas propriedades manifestam-se nos radicais livres em meias-vidas muito baixas, chegando a valores na ordem de  $10^{-27}$ s e a capacidade de reagir com qualquer biomolécula, sendo necessário apenas que estas biomoléculas existam na proximidade do local de formação do radical livre (HALLIWELL, 2007).

Uma molécula pode tornar-se um radical livre tanto ganhando como perdendo um elétron em uma reação química, bem como por fissão homogênea de uma ligação química. Normalmente o rompimento de uma ligação química ocorre de maneira heterogênea, chamada fissão heterolítica, na qual um dos átomos da

ligação química retém ambos os elétrons compartilhados, tornando-se um íon negativamente carregado (ou ânion), enquanto o outro átomo perde ambos os elétrons tornando-se um íon positivamente carregado (ou cátion). Porém, nas situações onde há grande oferta de energia, tal como durante exposição à radiação ultravioleta (UV), a ligação química poderá ser rompida de maneira que cada um dos átomos que participa da ligação química retenha um dos elétrons compartilhados na ligação, tornando-se radicais livres. Este fenômeno é denominado fissão homolítica e pode ser um mecanismo importante na iniciação da peroxidação lipídica, fenômeno associado à lesão celular (HALLIWELL, 2007).

Embora algumas moléculas importantes nos processos oxidativos não se encaixem na definição química de radical livre, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são consideradas as principais espécies químicas relacionadas a mecanismos patogênicos em humanos e animais. As principais ROS são cinco: radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^{\bullet-}$ ), radicais alquila ( $R^{\bullet-}$ ) e radicais peroxila ( $ROO^{\bullet-}$ ), sendo os dois primeiros responsáveis pelo desencadeamento da produção dos outros três. As ROS, apesar de incluírem diversas moléculas radicais livres, incluem outras que não obedecem necessariamente à definição de radicais livres, embora sejam importantes no metabolismo oxidativo. É o caso do  $H_2O_2$ , que não é um radical livre (não possui elétron solitário na camada de valência), mas é fundamental para a produção do  $OH^{\bullet-}$ , seja pela reação de Haber-Weiss (Figura 4), seja pela reação de Fenton (Figura 5; HALLIWELL, 2007).

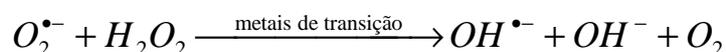


Figura 4: Reação de Haber-Weiss. O radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) reage com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), na presença de metais de transição, para produzir radicais hidroxila ( $OH^{\bullet-}$ ), íons hidroxila ( $OH^-$ ) e oxigênio ( $O_2$ ).

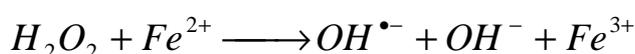


Figura 5: Reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é ionizado na presença de íons ferrosos, levando à produção de radicais hidroxila ( $OH^{\bullet-}$ ) e íons hidroxila ( $OH^-$ ). O íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ) sofre oxidação sendo liberado na forma de íon férrico ( $Fe^{3+}$ ).

A despeito de sua baixa reatividade, o  $O_2^{\bullet-}$  e o  $H_2O_2$ , capazes de pequena ação direta sobre constituintes celulares causando-lhes danos, são considerados importantes pelo fato de reagirem entre si para produzir o  $OH^{\bullet-}$ , através da reação de Haber-Weiss (Figura 4), Atuando sobre lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos, em um fenômeno chamado de "estresse oxidativo", o  $OH^{\bullet-}$  leva a modificações da função e estrutura celular que, por sua vez, poderão levar esta célula à morte.

As ações do  $OH^{\bullet-}$  sobre ácidos nucléicos podem causar modificações estruturais na molécula do DNA, implicando na sua destruição ou em mutações gênicas; sobre carboidratos (principalmente em glicosaminoglicanos) são capazes de provocar quebras da estrutura, incorrendo na perda do reconhecimento do contato celular, podendo levar a divisões celulares não limitadas pelo contato com células vizinhas; nas proteínas, as ROS causam a peroxidação protéica, que promovem a quebra de cadeias polipeptídicas, perda e/ou alteração de atividade enzimática; sobre lipídios causam a peroxidação lipídica, que é o principal responsável pelas alterações da permeabilidade da membrana celular (HALLIWELL, 2007).

Mesmo nas agressões onde as ROS não são a causa primária da lesão, elas são importantes porque toda destruição celular libera ferro, o qual catalisa a geração do  $OH^{\bullet-}$ , que é bastante reativo, sendo capaz de iniciar a peroxidação lipídica e geralmente resultando na destruição das membranas celulares das células vizinhas e na propagação do dano celular (HALLIWELL, 2007).

O estresse oxidativo é, assim, definido como um desequilíbrio entre os elementos pró-oxidantes e os antioxidantes, em que os pró-oxidantes formados estão aumentados. Portanto, o estresse oxidativo resulta da produção em excesso de ROS ou da redução da capacidade antioxidante do organismo (PABÓN *et al.*, 2003; SOHAIL *et al.*, 2007).

### 1.2.1 - O Estresse Oxidativo na Malária

O papel do estresse oxidativo durante a infecção malárica não está claro, alguns autores indicam um papel protetor, enquanto que outros sugerem relação

com a fisiopatologia da doença (SOHAIL *et al.*, 2007). No entanto, recentes estudos sugerem que a geração ROS e o estresse oxidativo associado desempenham um papel crucial no desenvolvimento de complicações sistêmicas da malária. A infecção malárica induz a geração de radical  $\cdot\text{OH}$  no fígado, que deve ser o principal responsável pela indução de estresse oxidativo e apoptose (GUHA *et al.*, 2006). Adicionalmente, Atamna *et al.* (1994) observaram que hemácias infectadas com *P. falciparum* produziram radicais  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{OH}^\cdot$  cerca de duas vezes mais em relação as hemácias normais.

A produção de ROS durante a infecção malárica ocorre via três mecanismos principais: um deles envolve a degradação de hemoglobina pelo parasita, onde o  $\text{Fe}^{+2}$  é oxidado a  $\text{Fe}^{+3}$ , depois o heme é separado da hemoglobina e os elétrons produzidos reagem com o oxigênio molecular para formar ROS; o segundo mecanismo requer a ativação da resposta imune do hospedeiro, que resulta na produção das citocinas  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IFN-}\gamma$ , com aumento na explosão respiratório e consequente geração de ROS nos fagócitos (PABÓN *et al.*, 2003); a terceira via envolve a síndrome de isquemia e reperfusão que é causada pela oclusão arterial, resultando em cessação de oferta de oxigênio, com desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial e, conseqüentemente, consumo das reservas celulares de adenosina trifosfato (ATP), além do aumento dos níveis de  $\text{Ca}^+$  intracelular e mediadores inflamatórios. A reperfusão é antagônica à isquemia e exacerba as lesões causadas pela isquemia através da geração de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio pelo sistema xantina oxidase (POUVELLE *et al.*, 2007; PHIRI *et al.*, 2009). Além disso, ocorre a geração de ROS por cadeia transportadora de elétrons, degradação de proteínas citosólicas ou reações redox do heme (POTTER *et al.*, 2005).

O aumento do estresse oxidativo no interior do vacuolo digestivo do *P. berghei* é um dos mecanismos para a destruição do parasita, como já se demonstrou pela ação de cloroquina e amodiaquina. Por outro lado, o estresse oxidativo pode aumentar as lesões oxidativas da membrana dos eritrócitos, reduzindo a capacidade de deformação destas células e, por fim, induzindo a remoção e destuição maciça dos eritrócitos por macrófagos, levando a anemia severa, oclusão de microvasculatura periférica, patologia cerebral (hipóxia) e danos cardíacos, observados em malária grave por *P. falciparum* (KAVISHE *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo pode ser avaliado em fluidos biológicos pela quantificação de produtos endógenos, resultantes da peroxidação lipídica, tais como o malondialdeído (MDA) ou pela avaliação da atividade de enzimas envolvidas nos mecanismos antioxidantes. O MDA é um aldeído endógeno produzido pela oxidação de ácidos graxos e tem sido usado como marcador do estresse oxidativo (ARAÚJO *et al.*, 2008).

### 1.2.2 – Peroxidação Lipídica e Hemólise em Eritrócitos Infectados

A ação das ROS nas membranas biológicas tem como consequência a peroxidação lipídica, evento que se caracteriza por uma cadeia de reações que se inicia com a retirada de um átomo de hidrogênio de um grupo carbonometileno da cadeia lateral de uma molécula de ácido graxo livre, transformando-o, igualmente, em uma ROS (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990). Para estabilizar sua configuração, essa ROS pode reagir com  $O_2$ , formando um radical peroxila, o qual sofre a ação de diversos agentes, dentre eles o  $Fe^{+2}$ , formando  $Fe^{+3}$  e  $OH^{\bullet-}$ , na reação de Fenton (Fig. 5). Assim, a partir destas reações em cadeia, os ácidos graxos livres se transformam em hidroperóxidos.

A peroxidação lipídica é um fenômeno complexo que apresenta várias reações químicas secundárias, resultando em uma gama de produtos, subprodutos e produtos intermediários, tais como os hidroperóxidos e dienos conjugados, compostos carbonílicos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA) - sendo o MDA o mais importante representante dessas moléculas e o mais utilizado para avaliação laboratorial da peroxidação lipídica - bem como produtos terciários, incluindo hidrocarbonetos voláteis e substâncias fluorescentes (KNIGHT *et al.*, 1988; ARAÚJO *et al.*, 2008).

Os resultados da peroxidação lipídica são alterações funcionais e estruturais da membrana plasmática, levando a hemólise, a qual tem sido sempre associada ao aumento da quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um indicador da peroxidação lipídica. Os altos níveis de produtos de peroxidação lipídica, tal como TBARS, são observados em hemácias parasitadas por *P. falciparum*, *P. vinckei*, *P. berghei* e *P. chabaudi* (DAS e NANDA, 1999). A figura 6 mostra esquematicamente este fenômeno.

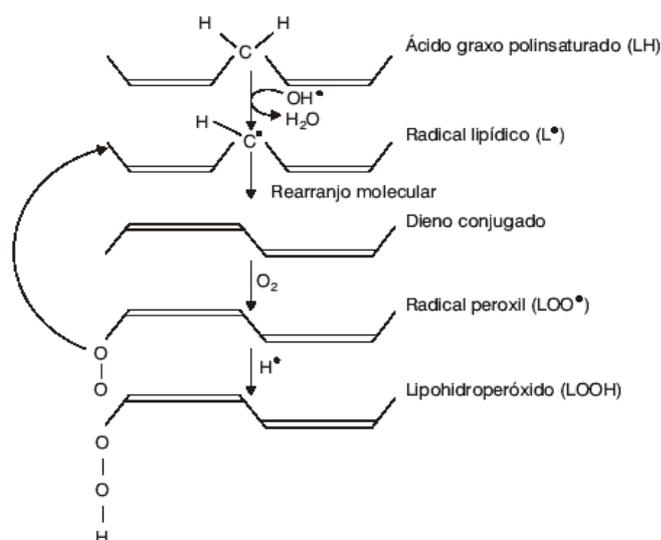


Figura 6: Representação esquemática da peroxidação lipídica dos ácidos graxos da membrana celular. O radical livre  $\text{OH}^{\bullet}$  abstrai um hidrogênio do ácido graxo, dando origem ao radical lipídico. Este, por ser instável, sofre um rearranjo molecular e forma um dieno conjugado, o qual pode reagir com uma molécula de oxigênio e formar um radical peróxido que abstrai um hidrogênio do ácido graxo, dando origem a uma reação em cadeia (Del Maestro, 1980).

De fato, Das e Nanda (1999), avaliaram a extensão e gênese do estresse oxidativo, bem como, a relação entre hemólise e estresse oxidativo em crianças infectadas pelo *P. falciparum* e observaram que as ROS parecem ser geradas tanto no interior dos eritrócitos infectados, quanto nos fagócitos do hospedeiro e que as ROS devem contribuir significativamente para o estresse oxidativo, como evidenciado pela baixa concentração plasmática de antioxidantes.

A hemólise ou danos extensivos à membrana pode levar a altas concentrações de heme livre, causando estresse oxidativo e inflamação. Uma vez liberado, o heme livre pode amplificar as lesões celulares e a resposta inflamatória (PORTO *et al.*, 2007).

A hemozoina, um metabólito do parasita liberado durante a esquizogenia, é capaz de induzir a liberação de citocinas ( $\text{TNF-}\alpha$  e interleucina  $-1\beta$ ) pelas células do sistema monócito/macrofágico. O heme livre é um poderoso gerador de radicais livres, pois possui átomos de ferro ( $\text{Fe}^{++}$ ) que podem catalisar reações de Fenton e Haber-Weiss, podendo causar sérios danos as biomoléculas, tanto do parasita quanto do hospedeiro (JAMARILLO *et al.*, 2005; KELLER *et al.*, 2006).

Adicionalmente, Porto *et al.* (2007), considerando que o heme induz a quimiotaxia dos neutrófilos, observaram que vários análogos do heme são capazes de induzir a migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, verificaram que as mesoporfirinas, moléculas que não possuem grupos vinil em seus anéis, não foram quimiotáticos para neutrófilos e inibiram seletivamente a migração induzida pelo heme. Os autores concluíram que o heme ativa os neutrófilos através de sinalização quimioatrativa e que as mesoporfirinas podem ser importantes no tratamento das consequências inflamatórias, como distúrbios hemorrágicos e hemolíticos.

O aumento da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo relatados na malária humana podem afetar a membrana de hemácias infectadas, promovendo a diminuição da deformidade destas células, o que tem sido associado ao aumento da mortalidade de adultos e crianças com malária. As consequências deletérias do aumento da rigidez do eritrócito incluem a obstrução microcirculatória (exacerbando a hipoperfusão tissular) e a rigidez celular, com posterior remoção pelo baço, aumentando a anemia (BECKER *et al.*, 2004).

Glenister *et al.* (2002), estudaram a contribuição das proteínas KAHRP (proteína rica em histidina associada a deformidade) e PfEMP3 (Proteína 3 de membrana eritrocitária de *P. falciparum*) no aumento da rigidez da membrana de hemácias infectadas. Os resultados mostraram que na ausência de ambas as proteínas, a membrana apresentou baixo nível de rigidez e que KAHRP teve maior efeito sobre a rigidez do que PfEMP3, sugerindo que estas proteínas do parasita contribuam para a rigidez das hemácias.

Em resposta ao aumento do estresse oxidativo, os seres vivos desenvolveram diferentes mecanismos de defesa antioxidante para remover ou diminuir a reatividade das ROS, mantendo o estado redox celular. Esta defesa é um mecanismo fisiológico do organismo contra a agressão provocada por ROS através do uso das reservas antioxidantes celulares, que evitam a geração de ROS por meio da varredura ou redução, formando compostos menos reativos (KAVISHE *et al.*, 2006).

### 1.3- A DEFESA ANTIOXIDANTE FISIOLÓGICA

Fisiologicamente, o organismo pode se defender da agressão causada pelas ROS utilizando as reservas antioxidantes celulares. Estas reservas são constituídas por três sistemas de defesa antioxidante: enzimático, moléculas pequenas e o sistema de quelação de metais, os quais reagem com as ROS e retardam ou previnem a oxidação de biomoléculas (PERCÁRIO, 2000).

O sistema antioxidante enzimático é composto por três tipos de enzimas principais: as enzimas superóxido dismutases (SOD), que atuam sobre o radical  $O_2^{\bullet-}$  transformando-o em  $H_2O_2$ , um produto menos tóxico. As SOD são representadas pela SOD-mitocondrial (mangânês dependente), a SOD-citoplasmática (dependente de cobre e zinco) e a SOD-extracelular (ferro dependente). Fazem parte do sistema antioxidante enzimático ainda, as enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px) selênio dependente e a catalase (dependente de ferro). Tanto a glutathiona peroxidase como a catalase atuam sobre o  $H_2O_2$  transformando-o em água. No entanto, o organismo não dispõe de enzimas que atuem sobre o radical hidroxila, verdadeiro causador de estresse oxidativo. Felizmente, para este fim, nosso organismo pode utilizar moléculas pequenas que diminuem a reatividade do radical hidroxila, tais como as vitaminas A, E e C, o beta caroteno, o ácido úrico e a molécula de GSH (FELIPPE Jr e PERCÁRIO, 1995; PERCÁRIO *et al.*, 2001).

Além da produção de enzimas antioxidantes e da utilização de moléculas pequenas como sistema auxiliar na defesa antioxidante, o organismo utiliza-se de proteínas que se ligam a metais de transição impedindo-os de catalisar as reações de Haber-Weiss (Fig. 4) e de Fenton (Fig. 5). Este sistema quelador de íons metálicos é composto por moléculas como a ferritina, a transferrina e a lactoferrina (queladoras de ferro), a ceruloplasmina e a albumina (queladoras de cobre) e um grupo de proteínas chamadas de metalotioneínas, as quais apresentam grupamentos tiólicos, capazes de se ligar a vários metais, tais como o chumbo e o cádmio (HALLIWELL, 2007).

### 1.3.1- Mecanismos de Defesa Antioxidante Envolvidos na Infecção pelo *Plasmodium*

Durante a infecção pelo *Plasmodium*, o hospedeiro humano se defende da agressão sofrida utilizando diferentes mecanismos antioxidantes. O principal deles é o sistema redox da glutathiona, que protege as células contra o estresse oxidativo através da “varredura” química das ROS (EREL *et al.*, 1997; Dumaswala *et al.* 2001; Glosli *et al.* 2002). Os elementos essenciais são a GSH-Px que reduz peróxido de hidrogênio ou peróxido lipídico; glutathiona-S-transferase (GST) que conjuga eletrófilos a GSH, e algumas bombas de membrana que podem retirar a glutathiona oxidada (GSSG) ou GSH conjugadas.

A GSH-Px é uma enzima sequestrante de peróxidos lipídicos dependente de selênio, com concomitante oxidação da glutathiona, tendo atividade antioxidante nos eritrócitos (POTTER *et al.*, 2005). A enzima é distribuída tanto em animais como em plantas e exerce um grande espectro de funções biológicas, desenvolvendo um papel antioxidante muito importante na defesa contra as lesões oxidativas das células pela varredura de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular (TRIVEDI *et al.*, 2005).

Outro sistema importante é o da tioredoxina que compreende a TrxR e tioredoxinas (Trx; KRNAJSKI *et al.*, 2002; BOZDECH *et al.*, 2004), que estão envolvidos na defesa antioxidante, redução de ribonucleotídeo, de peroxidases e fatores de transcrição (BECKER *et al.*, 2004). Semelhante a glutathiona, a tioredoxina pode interagir com diversas proteínas e pode ser novamente reduzida *in vivo* pela enzima TrxR, com o consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) para a redução das ligações dissulfeto (HALLIWELL, 2007).

A redução da GSSG pode ser facilitada pela alta taxa do sistema TrxR/Trx nas células deficientes de glutathiona redutase, o que deve ser importante em alguns estágios do *Plasmodium* (KANZOK *et al.*, 2000). Desse modo, os sistemas redox da tioredoxina e da glutathiona parecem representar dois meios poderosos de detoxificação das ROS para o *P. falciparum* e são sistemas eficientes para impedir o desenvolvimento do parasita no interior das células do hospedeiro (MÜLLER *et al.*, 2001).

A enzima SOD também é importante na defesa antioxidante, pois tem a propriedade de dismutar o radical O<sub>2</sub><sup>•</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Isto pode ocorrer no vacúolo digestivo, que pode ser considerado o maior gerador de ROS, onde a

ferroprotoporfirina IX é oxidada de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  com consequente produção de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  (BECKER *et al.*, 2004). O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , contudo, também precisa ser detoxificado por peroxidases ou catalase porque, na presença de átomos metálicos reduzidos, pode transformar-se em um radical  $\text{OH}^{\bullet}$  altamente reativo. A catalase é uma enzima tetramérica que converte eficientemente  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio sem produção de ROS (BOZDECH *et al.*, 2004; De JONG *et al.*, 2007). Por outro lado, a expressão de citocinas induzidas pela hemozoína parece ser dependente da produção de ROS e pode ser inibida pela adição da SOD (PINO *et al.*, 2005). A figura 7 mostra esquematicamente os mecanismos de defesa antioxidante envolvidos na infecção pelo *Plasmodium*.

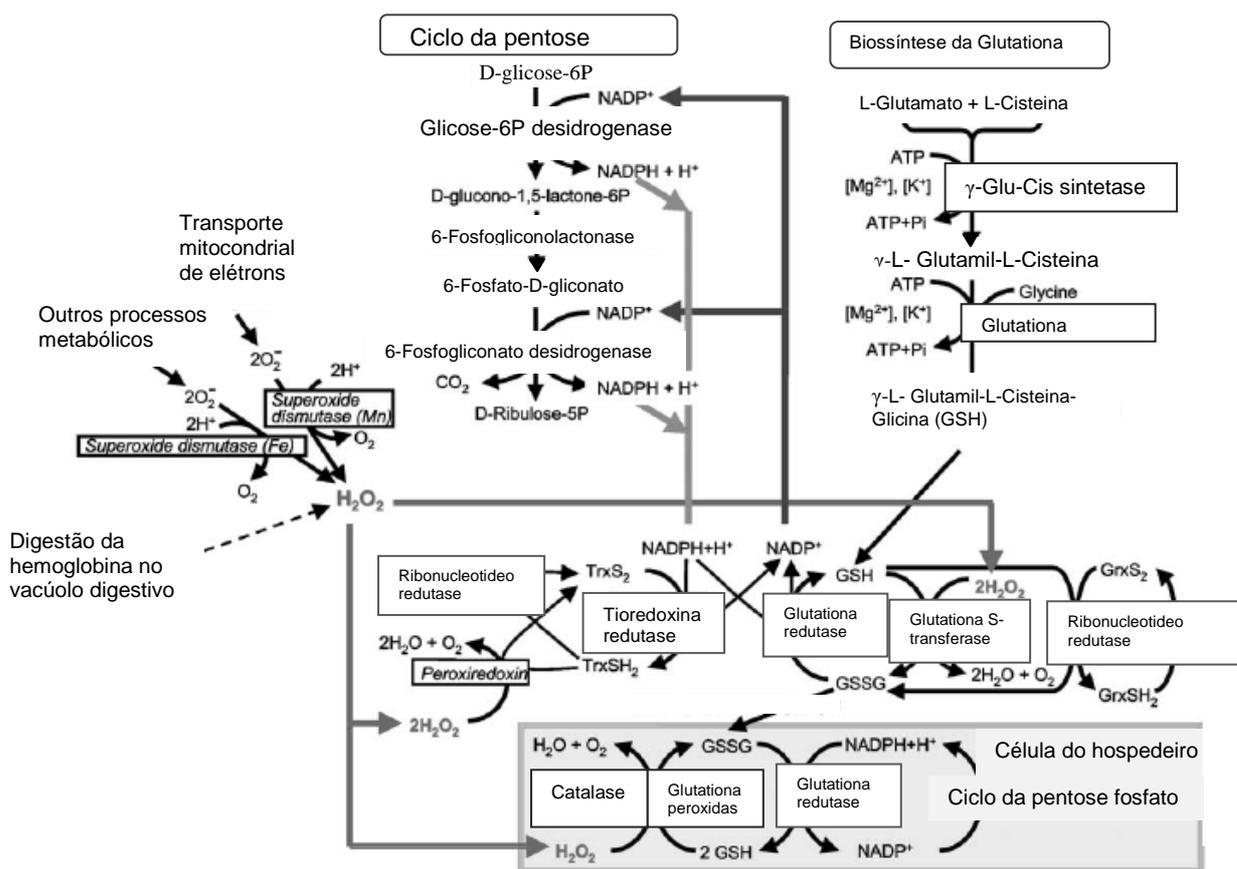


Figura 7: Representação esquemática da defesa antioxidante no eritrócito infectado pelo *plasmodium* (BECKER *et al.*, 2004).

A GSH é uma molécula pequena que desempenha importantes papéis nas hemácias infectadas pelo *P. falciparum*, protegendo as hemácias do estresse oxidativo e modulando as modificações de membrana induzidas pelo parasita e pelo catabolismo do heme. A homeostase da GSH é regulada por várias enzimas, tais como glutathione redutase, GSH-Px e GST (GLOSLI *et al.*, 2002). A GSH serve como substrato para um grande número de processos de redução, como aqueles mediados por tioredoxina redutase (TrxR) e GST, resultando na formação de GSSG (BOZDECH *et al.*, 2004).

A G6PD é uma enzima expressa em todos os tipos celulares do organismo e também auxilia nas vias antioxidantes pela geração de NADPH, que é consumida pelo ciclo redox da glutathione, dando suporte as vias antioxidantes celulares. Mutações na G6PD provavelmente fornecem alguma proteção contra as complicações da malária grave. A deficiência de G6PD é o polimorfismo genético mais comum na população humana, afetando mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo (WILMANSKI *et al.*, 2005; PRCHAL *et al.*, 2005).

Nesse sentido, Pino *et al.* (2005), verificaram que macrófagos deficientes de G6PD, têm um aumento na produção de interleucina-10 (IL-10) e interleucina-12 (IL-12), que são envolvidas na produção de ROS nestas células. Do mesmo modo, Wilmanski *et al.* (2005), avaliaram se a deficiência de G6PD manifesta alterações na produção de citocinas em macrófagos peritoneais de ratos e encontraram que esta deficiência está ligada ao aumento na produção das citocinas com impacto na produção de IL-10, modulando a resposta imune.

Recentemente tem se relatado a expressão de heme oxigenase-1 (HO-1) em indivíduos que morreram de malária causada pelo *P. falciparum*. A HO-1 é uma enzima que degrada heme, produzindo biliverdina, ferro e monóxido de carbono (CO), o qual se liga a hemoglobina para formar carboxihemoglobina (COHb). HO-1 e CO são considerados protetores devido apresentarem um potente efeito anti-inflamatório. O aumento da expressão de HO-1 reduz a inflamação induzida pelo heme e promove a expressão de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, CO protege o fígado das lesões pela síndrome de isquemia e reperfusão em ratos deficientes de HO-1. Assim, humanos deficientes de HO são caracterizados pela vulnerabilidade às lesões oxidativas e inflamatórias (CUNNINGTON *et al.*, 2004).

### 1.3.2 - Mecanismos de Defesa Pró-Oxidante Envolvidos na Infecção pelo *Plasmodium*

Tem se demonstrado que o estresse oxidativo está relacionado com um papel protetor em portadores de malária (GUHA *et al.*, 2006). Tanto as ROS quanto as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são sugeridas como possíveis agentes capazes de destruir o *Plasmodium*. Assim, o  $H_2O_2$  e o  $O_2^{\bullet}$  podem funcionar independentemente como agentes citotóxicos ou formar outras moléculas tóxicas, incluindo o radical  $OH^{\bullet}$ , ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) na presença de óxido nítrico (NO; GILLMAN *et al.*, 2004).

O radical  $ONOO^{\bullet}$  é um poderoso modificador de proteínas e seus efeitos incluem a nitrosação de cisteína, oxidação de cisteína, triptofano e metionina e nitração de tirosina. Em uma grande variedade de doenças humanas, tem se observado níveis elevados de nitrotirosina intra e extracelularmente, o que implica o  $ONOO^{\bullet}$  como um agente fisiopatológico. De fato,  $ONOO^{\bullet}$  está envolvido na fisiopatologia da malária cerebral e várias outras doenças infecciosas e parasitárias e seus efeitos agravam quando os níveis de glutathione estão diminuídos (SAVVIDES *et al.*, 2002).

O aumento na produção de ROS pelos fagócitos, como parte da defesa do hospedeiro, é um evento primário da malária. As ROS geradas pelos macrófagos são conhecidas como moléculas efetoras não específicas no seu arsenal de defesa, que pode contribuir para as lesões oxidativas ao parasita, bem como aos eritrócitos parasitados ou não, uma vez que as ROS são capazes de se difundir através da membrana das hemácias (DAS e NANDA, 1999). Do mesmo modo, neutrófilos secretam enzimas proteolíticas e ROS, os quais podem desencadear apoptose de células endoteliais em baixas concentrações e necrose em altas concentrações (HEMMER *et al.*, 2005).

O *Plasmodium* é muito vulnerável ao estresse oxidativo durante a fase eritrocítica. À medida que a infecção progride, o parasita também leva a ativação de macrófagos, com consequente liberação de ROS no meio extracelular (TRIVEDI *et al.*, 2005). Por isso, as ROS são frequentemente discutidas na literatura como mecanismo na imunidade antimalárica e patogênese da doença (CLARK *et al.*, 1989). Assim, o estresse oxidativo aumentado pode representar um mecanismo

promissor de quimioterapia antimalárica devido ao número de evidências sugerindo de que ele pode inibir efetivamente o crescimento do parasita (TRIVEDI *et al.*, 2005).

De fato, é geralmente aceito que as ROS, incluindo  $O_2^{\bullet}$ ,  $ONOO^{\bullet}$  e NO, destroem o parasita intraeritrociticamente (SOBOLEWSKI *et al.*, 2005). Portanto, a malária grave causada por *Plasmodium falciparum* está associada à ativação de neutrófilos e monócitos, níveis elevados de citocinas e lesões endoteliais. Assim, os neutrófilos ativados e seus produtos secretados podem exercer não apenas atividade antiparasitária, mas também lesões endoteliais, que podem levar a falência orgânica na malária grave (HEMMER *et al.*, 2005).

### 1.3.3 – A Defesa Antioxidante do *Plasmodium*

Para se proteger dos mecanismos de defesa pró-oxidantes do hospedeiro, o *Plasmodium* possui um sistema enzimático composto pelas enzimas SOD, GST e tioredoxinas, bem como, por moléculas pequenas, tais como a GSH. Além disso, o sistema antioxidante do parasita é constituído com proteínas do estresse, que formam um segundo sistema protetor de células e organelas contra o estresse térmico e oxidativo presentes na malária *falciparum* (AKIDE-NDUNGE *et al.*, 2009).

Durante o desenvolvimento intra-eritrocítico do *P. falciparum*, as ROS são produzidas tanto pelo parasita quanto pelas hemácias do hospedeiro. No entanto, o parasita possui uma organela, chamada apicoplasto, que é essencial à sua sobrevivência, sendo utilizada para evitar o dano oxidativo causado pelo hospedeiro, sintetizando o ácido lipóico, um potente antioxidante (TOLER, 2005).

O sistema TrxR/Trx é o principal mecanismo envolvido na defesa antioxidante do *Plasmodium*, transferindo elétrons de NADPH à moléculasceptoras, como peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos, e também a proteínas, como ribonucleotideo reductase e fatores de transcrição (KANZOK *et al.*, 2000; KRNAJSKI *et al.*, 2002). Este sistema está envolvido na redução de ribonucleotideo e, conseqüentemente, na síntese de DNA, o que o torna essencial para a sobrevivência dos estágios eritrocíticos do parasita (KRNAJSKI *et al.*, 2002).

Outra importante enzima antioxidante envolvida na proteção do parasita é a GST, que age na detoxificação de fase II, catalisando a conjugação de GSH com

uma grande variedade de substratos eletrófilos. Além de reações de conjugação, algumas GST podem catalisar a redução de hidroperóxidos gerados, dependente de GSH, por exemplo, durante o estresse oxidativo. A GST também é capaz de se ligar a compostos endógenos, tais como hormônios, heme e bilirrubina. A atividade de GST tem sido detectada em todas as espécies de *Plasmodium* estudadas, bem como, em todos os estágios intra-eritrocíticos do parasita (HILLER *et al.*, 2006).

Além dos mecanismos de defesa antioxidantes citados, Mashima *et al.* (2002), verificaram que o complexo proteína 2 rica em histidina do *Plasmodium falciparum* ligada a ferriprotoporfirina IX (PfHRP2-FePPIX) tem propriedades antioxidantes benéficas ao parasita pode não ser previamente reconhecido pelos antioxidantes do hospedeiro. Em pH neutro, a PfHRP2 modula a atividade redox da ferriprotoporfirina IX, protegendo o ascorbato da degradação induzida pela FePPIX, atenuando a formação de radicais alcoxil e hidroxila.

Somando-se a defesa antioxidante do *Plasmodium*, Sobolewski *et al.* (2005) analisaram os efeitos do NO e ROS no *Plasmodium berghei ex vivo* para estudar os mecanismos de evasão do parasita frente à defesa pró-oxidante do hospedeiro, com atenção particular para o estado molecular da hemoglobina. Os pesquisadores verificaram que a hemoglobina envolve o parasita e protegendo-o das ROS.

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 - RESPOSTA IMUNE E PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA MALÁRIA

A resposta imune na infecção malárica envolve diversas citocinas, tais como, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , as quais são necessárias para o hospedeiro humano combater a invasão do parasita, mas a alta produção de citocinas também pode ser muito prejudicial ao hospedeiro. Níveis elevados de TNF-  $\alpha$  podem causar febre e desordens no sistema imune, mas TNF- $\alpha$  e IFN-  $\gamma$  também promovem a expressão de receptores endoteliais, tais como ICAM-1, e, provavelmente, CD31 no endotélio (CHEN *et al.*, 2000). Além disso, a maioria dos mecanismos para a destruição do parasita envolve a produção de IFN- $\gamma$ , por células Th1 induzidas na infecção aguda pelo *Plasmodium*, a qual ativa macrófagos a secretar NO e ROS contra o *plamodium* (SOBOLEWSKI *et al.*, 2005).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina envolvida em várias doenças e muitas de suas ações estão relacionadas ao envolvimento do estresse oxidativo (GLOSLI *et al.*, 2002). Sendo assim, Clark *et al.*, (2004) verificaram que TNF- $\alpha$  poderia induzir células endoteliais a gerar NO, que os neurônios respondem ao NO e que, assim como o oxigênio, ele pode atravessar livremente as membranas celulares, portanto, a indução da síntese de NO por TNF- $\alpha$  nas paredes dos vasos sanguíneos cerebrais poderia fornecer uma ligação plausível entre TNF- $\alpha$  e coma. Não obstante, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são altamente produzidas durante a CM e são, às vezes, detectáveis em altas concentrações em ratos e em pacientes com CM (LOU *et al.*, 2001).

Outra citocina que parece estar envolvida na malária é o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), atuando de forma efetiva na imunidade celular contra o *Plasmodium*, conforme demonstrado em modelos experimentais (KAUR *et al.*, 2004). Em estudo semelhante, animais deficientes na síntese de GM-CSF apresentavam resposta imune prejudicada frente à infecção pelo parasita (RIOPEL *et al.*, 2001). Também é provável a relação entre o GM-CSF e o NO, conforme demonstrado por Kaur *et al.* (2004) onde o pré-tratamento com GM-CSF e metionina-enkefalina (ME) protegeu camundongos da malária. No entanto, quando os animais também foram pré-tratados com inibidores totais e da forma induzível da NOS, a mortalidade dos animais aumentou significativamente, sugerindo que a proteção exercida pelo GM-CSF/ME seja, ao menos parcialmente, devido ao NO.

O NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina por ação das enzimas óxido nítrico sintetase (NOS). Três isoformas da enzima NOS são caracterizadas, baseado na localização tecidual, sendo duas formas constitutivas (c-NOS) e uma induzível (i-NOS). As formas constitutivas incluem: NOS neuronal ou NOS-1, expressa pelas células nervosas durante a neurotransmissão, e NOS endotelial ou NOS-3, produzida pelas células endoteliais para promover vasodilatação. A forma induzível é a NOS inflamatória ou NOS-2, produzida pelas células fagocíticas em resposta aos patógenos (GILLMAN *et al.*, 2004; DHANGADAMAJHI *et al.*, 2009). Quando a NOS produz o NO, grande quantidade dele é liberada na corrente sanguínea, podendo ser varrido pela hemoglobina (Hb) nos eritrócitos ou convertido a nitrito na presença de oxigênio molecular (MAY *et al.*, 2000).

As funções do NO estão relacionadas ao relaxamento vascular, neurotransmissão e citotoxicidade celular contra vários micro-organismos, por ativação da guanilato ciclase para produzir o segundo mensageiro guanidina monofosfato cíclico (cGMP; FRITSCHÉ *et al.*, 2001; FERNHOFF *et al.*, 2009). Apesar de ser um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais, o NO é potencialmente tóxico, particularmente em situações de estresse oxidativo, com alta produção de ROS, e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE *et al.*, 2003). O papel do NO na malária não está claro, mas alguns pesquisadores sugerem que a malária cerebral seja consequência da alta produção de NO para promover a morte dos parasitas (YEO *et al.*, 2007; CABRALES *et al.*, 2011). Por outro lado, alguns defendem a ideia de que a malária cerebral decorra da baixa disponibilidade desta substância (GRAMAGLIA *et al.*, 2006).

De acordo com Jaramillo *et al.* (2003), além da peroxidação lipídica, sabe-se que o NO pode desempenhar papel fundamental na eliminação do parasita, no entanto, seu excesso causa imunossupressão, assim como, pode acarretar o desenvolvimento da malária cerebral. Além de algumas moléculas do parasita serem bem conhecidas como indutoras de NO, há uma contribuição direta do pigmento malárico, a hemozoina, que, associado ao IFN- $\gamma$ , mediador de síntese de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) para iNOS, é um potente indutor da geração de NO em macrófagos. Anos mais tarde, Jaramillo *et al.* (2005) também verificaram que além de induzir a síntese de NO, a hemozoina seria responsável pela ativação de macrófagos por mecanismos parcialmente dependentes de NO.

Paralelamente, May *et al.* (2000) buscaram compreender a ação do nitrito nas hemácias e se essa ação causa estresse oxidativo nessas células. Verificaram que o nitrito penetra rapidamente nos eritrócitos e reage com a oxihemoglobina, levando a formação de metemoglobina, mas não promove alto estresse oxidativo nessas células.

## 2.2- EVIDÊNCIAS DAS ALTERAÇÕES DA DEFESA ANTIOXIDANTE EM PORTADORES DA MALÁRIA

### 2.2.1- Em Modelos Experimentais da Malária

O padrão de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA consiste de uma síndrome neurológica que ocorre de 6 a 14 dias após a infecção e com uma mortalidade de cerca de 90%. As manifestações neurológicas incluem paraplegia, ataxia e convulsões. Os 10% restantes dos ratos infectados morrem dentro de 3 a 4 semanas, com anemia severa, hiperparasitemia e sem sinais neurológicos (LOU *et al.*, 2001). As lesões hepáticas durante a infecção pelo *P. berghei*, aumentam a expressão do mRNA de IL-12, proteína 40 (p40), IFN-  $\gamma$ , IL-4, e IL-10, com consequente aumento na síntese de NO (YOSHIMOTO *et al.*, 1998).

Durante a infecção malárica pelo *Plasmodium* em roedores, ocorre diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes, tais como catalase, GSH-Px, SOD, além de albumina, GSH, ascorbato e tocoferol plasmático. A infecção aumenta a atividade da xantina oxidase e o conteúdo de peróxidos lipídicos no fígado, indicando a ocorrência de estresse oxidativo hepático na malária (GUHA *et al.*, 2006). Adicionalmente, como a infecção malárica resulta em mudanças na produção de citocinas, incluindo IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, é possível que essa produção em células deficientes de G6PD possa contribuir para a modulação da resposta inflamatória ao *Plasmodium* (WILMANSKI *et al.*, 2005).

Marcadores do estresse oxidativo em ratos parasitados encontram-se em níveis elevados, comparados a controles não infectados (SOHAIL *et al.*, 2007). Nesses casos, o estresse oxidativo parece decorrer do aumento nos níveis de ROS, conforme observado pelo aumento dos níveis de MDA, e não em decorrência da diminuição nas taxas de antioxidantes, sugerindo que o estresse oxidativo seja um mecanismo importante na infecção pelo parasita (PABÓN *et al.*, 2003).

Por outro lado, Potter *et al.* (2005) verificaram que a ausência da expressão da enzima NADPH oxidase em camundongos *Knockout*, não apresentou diferença na progressão da parasitemia em nenhuma das espécies de *Plasmodium* testadas (*P. yoelii*, *P. chabaudi* K562, *P. berguei* ANKA, *P. berguei* K173 e *P. Vinckei vinckei*). Estes dados levaram à sugestão de que a produção de ROS esteja aumentada em decorrência da infecção, bem como pela produção de NO e diminuição da defesa antioxidante.

Stocker *et al.* (1985) examinaram a proteção das hemácias de ratos parasitados pelo *Plasmodium vinckei vinckei* contra ROS ativadas em relação a carga parasitária intra-eritrocítica. Foi observado que o aumento na carga parasitária é acompanhado pela diminuição na atividade das enzimas SOD, catalase, GSH-Px, glutathione redutase, NADPH e NADH-metemoglobina nas hemácias lisadas. Em contraste, a quantidade total de GSH aumentou nos grupos altamente parasitados. Ademais, o conteúdo de vitamina E em todos os grupos de hemácias, incluindo o que havia principalmente hemácias parasitadas, foi de três a cinco vezes superior ao controle de hemácias não infectadas. O aumento da carga parasitária foi acompanhado por um aumento na produção de MDA, indicando peroxidação lipídica. Estes resultados indicam que o estresse oxidativo ocorre em todas as hemácias durante a infecção malárica, sendo acompanhado por uma variedade de mudanças nos mecanismos de defesa antioxidante do hospedeiro e do parasita.

### **2.2.2- Em Pesquisas Clínicas da Malária**

O metabolismo redox alterado nas células do hospedeiro, particularmente as endoteliais, pode exacerbar as complicações da malária, por exemplo, pelo aumento das lesões endoteliais, inflamação cerebral e desenvolvimento de malária cerebral (KAVISHE *et al.*, 2006).

De fato, em portadores de malária, diversos antioxidantes são encontrados em níveis plasmáticos diminuídos, tais como as enzimas GST (KAVISHE *et al.*, 2006; SOHAIL *et al.*, 2007), catalase, GSH-Px, SOD, NADPH-metahemoglobina redutase (BECKER *et al.*, 2004); os queladores de metais desferroxiamina e ferritina; as moléculas pequenas como a GSH (DUMASWALA *et*

*al.*, 2001), as vitaminas A, E, C; pró-vitaminas  $\alpha$  e  $\beta$  caroteno e licopeno (METZGER *et al.*, 2001; CAULFIELD *et al.*, 2004).

Desse modo, Erel *et al.* (1997) investigaram estresse oxidativo e estado antioxidante plasmático nos eritrócitos de pacientes com malária vivax. Os resultados mostraram baixos níveis de atividade de enzimas antioxidantes, o que sugere que os mecanismos oxidativos sejam dominantes, se comparados aos mecanismos antioxidantes nesses pacientes, sendo uma importante via de defesa contra a infecção.

Griffiths *et al.* (2001) determinaram as concentrações de  $\alpha$ -tocoferol no plasma e na membrana do eritrócito, além da proporção de ácidos graxos poli-insaturados (%PUFA) em crianças com malária grave no Quênia. Os resultados mostraram uma redução significativa na concentração do  $\alpha$ -tocoferol e da %PUFA na membrana do eritrócito, mas não encontraram diferença significativa nas concentrações de  $\alpha$ -tocoferol no plasma em relação ao controle, sugerindo que a infecção deve estar associada com o dano oxidativo e baixas concentrações de  $\alpha$ -tocoferol na membrana do eritrócito e que a depleção de antioxidantes deve contribuir para a perda de eritrócitos na malária grave.

Das e Nanda (1999) avaliaram a extensão do estresse oxidativo em eritrócitos de pacientes com malária aguda por *Plasmodium falciparum* e encontraram valores reduzidos de catalase, GSH e tocoferol em relação aos controles, mostrando um aumento no estresse oxidativo intra-eritrócitário, que pode contribuir substancialmente para hemólise e anemia.

Pabón *et al.* (2003) compararam o estresse oxidativo em pacientes adultos com malária *vivax* ou *falciparum* não-complicada em relação a pessoas saudáveis, através da dosagem de MDA, estado antioxidante total (TAS), Catalase, SOD e GSH-Px. Os resultados mostraram que o índice MDA/TAS foi 3,5 vezes maior em relação aos controles e os índices de MDA/GSH-Px e SOD/catalase foram aumentados em 6 e 2,8 vezes, respectivamente, mostrando que durante a malária aguda não-complicada existe alto nível de estresse oxidativo. Além disso, a infecção malárica resultou em diminuição dos níveis das enzimas antioxidantes, como catalase, GSH-Px e SOD, além de albumina, GSH, ascorbato e tocoferol plasmático. Do mesmo modo, Yazar *et al.* (2004) investigaram o estresse oxidativo em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* através da determinação de MDA no soro e

encontraram níveis elevados de MDA nos pacientes infectados em relação aos controles.

Nanda e Das (2000) examinaram a influência dos fatores extracelulares no estresse oxidativo e hemólise, valores basais de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do eritrócito e indicadores hemolíticos como hemoglobina plasmática e lactato desidrogenase (LDH) foram estimadas em 19 crianças de Orissa (Índia) com malária aguda por *P. falciparum*. Os valores basais de LDH plasmático, hemoglobina e concentrações de TBARS foram significativamente maiores em pacientes com malária do que em crianças não-infectadas. Na pós-incubação com hidroperóxido t-butil (t-BHP), os valores de TBARS e hemoglobina plasmática estavam significativamente aumentados. Assim, o plasma de pacientes com malária aguda parece conter pró-oxidantes, que podem contribuir para o estresse oxidativo extracelular tanto em hemácias parasitadas como em não-parasitadas.

Sohail *et al.* (2007) pesquisaram o papel da GST como marcador bioquímico em pacientes com malária vivax, bem como compararam a atividade de GST em adultos com malária vivax não complicada. Os resultados mostraram concentrações diminuídas de GST no soro e plasma dos pacientes em relação aos controles, além de alto nível de peroxidação lipídica e maior atividade de catalase nos pacientes com malária vivax. Assim, a diminuição da atividade de GST e atividade elevada de peroxidação lipídica e catalase podem ter um importante papel nos mecanismos de defesa contra a infecção pelo *P. vivax* através da expressão dos mecanismos de defesa antioxidante.

Erel *et al.* (2001) demonstraram que o número de plaquetas e as atividades das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px de pacientes com malária vivax estavam diminuídas, bem como que a peroxidação lipídica de plaquetas, estimada pela determinação do MDA, foi mais intensa em pacientes maláricos do que em indivíduos saudáveis, existindo correlação negativa entre número de plaquetas e nível de peroxidação lipídica plaquetária. Estes dados sugerem que o estresse oxidativo tem um papel importante na etiopatogênese da trombocitopenia presente na malária, considerando-se que o estresse oxidativo causa a perda da elasticidade de membranas, aumentando sua fragilidade e provocando a disfunção de receptores, prejudicando consideravelmente a função plaquetária.

Metzger *et al.* (2001) tentando compreender a relação entre a infecção por *Plasmodium falciparum* e antioxidantes, bem como a associação entre o *clearance* da parasitemia e vitaminas A, E e carotenóides, realizaram um estudo longitudinal em crianças de Kampala e Uganda com malária aguda não-complicada. As concentrações plasmáticas desses antioxidantes estavam diminuídas e não houve relação da baixa concentração de vitamina E no plasma com o *clearance* da parasitemia.

## 2.3 – ESTUDOS DE INTERVENÇÕES COM ANTIOXIDANTES

### 2.3.1- Em Modelos Experimentais

As substâncias antioxidantes devem desempenhar um importante papel durante a infecção pelo *plasmodium*. Desse modo, antioxidantes, como o  $\alpha$ -tocoferol, podem prevenir a apoptose pela inibição das caspases. Na malária causada pelo *P. berghei*, a administração de  $\alpha$ -tocoferol preveniu complicações cerebrais, sugerindo que a inibição da apoptose por estes antioxidantes pode realmente ser reprodutível *in vivo*. Os antioxidantes e os inibidores de proteases podem oferecer benefícios clínicos pela prevenção das complicações orgânicas devido a apoptose endotelial, mesmo que não possam acelerar o *clearance* do parasita (HEMMER *et al.*, 2005).

Herbas *et al.* (2010) tentando compreender a influência da vitamina E no desenvolvimento do *Plasmodium* em CM murina, inibiram a proteína de transferência de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP), um regulador de vitamina E no *Plasmodium berghei* ANKA. Os resultados mostraram que os ratos *knockout* para  $\alpha$ -TTP infectados com *P. berghei* ANKA não exibiram nenhum sinal clínico ou patológico de CM e que a proteção da barreira hemato-encefálica (BHE) nestes ratos *knockout* para  $\alpha$ -TTP infectados foi perdida quando a suplementação da dieta com vitamina E foi adicionada a dieta deles. Além disso, as interleucinas e moléculas de adesão no cérebro dos ratos controles foram significativamente expressas, quando comparado com os ratos *knockout* para  $\alpha$ -TTP. Isto sugeriu que a deficiência de  $\alpha$ -tocoferol na circulação previne a CM e que  $\alpha$ -TTP é um suposto marcador para a prevenção inicial da CM.

Os efeitos prejudiciais de heme na deformidade das hemácias podem ser prevenidos e revertidos pela adição de antioxidantes como NAC ou GSH. Isto é

consistente com a ação de NAC contra as lesões oxidativas no citoesqueleto de eritrócitos (STRAFACÉ *et al.*, 2002). Nesse sentido, Nuchsongsin *et al.* (2007) investigaram os efeitos dos produtos do heme na deformidade das hemácias e o potencial protetor de NAC em comparação com a GSH, em modelo *ex vivo*. Os resultados mostraram que heme causa diminuição na deformidade das hemácias e diminui o volume médio destas células. Além disso, NAC e GSH podem prevenir a rigidez da célula induzida pelo heme, fornecendo uma nova modalidade de intervenção em pacientes com malária grave, pois podem melhorar o fluxo microcirculatório na malária grave e prevenir a destruição das hemácias.

Paralelamente, Yuminamochi *et al.* (2007) pesquisaram os efeitos de extratos de *A. blazei* na citotoxicidade de células *natural Killer* (NK) usando genes alvos de ratos e demonstraram que *A. blazei* e partículas compostas de hemicelulose induziram a produção de IFN- $\gamma$  mediada por IL-12, dependente de receptor *Toll like-4* (TLR-4) e aumento da citotoxicidade das células NK.

### 2.3.2 – Em Pesquisas Clínicas

No que concerne a avaliação clínica da intervenção com antioxidantes na malária, poucos estudos são relatados na literatura em relação a NAC e não há publicações acerca dos efeitos da suplementação com o *Agaricus sylvaticus*. De todo modo, Watt *et al.* (2002) pesquisaram a administração de NAC em pacientes com malária por *P. falciparum* como terapia adjuvante na malária grave e observaram que NAC acelerou a recuperação desses pacientes, podendo reduzir a obstrução microvascular ao fluxo sanguíneo.

A melhora no estado nutricional está diretamente relacionada a proteção contra a malária. Assim, existem vários nutrientes desempenham importantes papéis no sistema imune e têm sido associados com incidência e diminuição da morbimortalidade na malária, especialmente em crianças abaixo de cinco anos de idade, que vivem em áreas de risco. Estes nutrientes incluem: o folato, ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, antioxidantes, riboflavina e tiamina (CAULFIELD *et al.*, 2004).

Estudos recentes mostram também que a administração de eritropoietina (EPO) em crianças está associada com a diminuição de sequelas neurológicas na

CM, diminuindo a expressão excessiva de citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , em amostras plasmáticas, podendo influenciar na evolução clínica da CM, sugerindo que EPO pode ser útil como terapia adjuvante na CM (CASALS-PASCUAL *et al.*, 2008).

Substâncias com alto poder antioxidante, como os carotenóides da dieta e a vitamina E tem se mostrado moduladores das funções imunes em humanos. Assim, eles poderiam fornecer proteção contra o estresse oxidativo induzido na infecção pelo *plasmodium* (METZGER *et al.*, 2001). De fato, Hemmer *et al.* (2005) investigaram se as lesões endoteliais induzidas por neutrófilos estariam ligadas à apoptose e se isso poderia ser prevenido pela neutralização de produtos secretados por neutrófilos. Os resultados mostraram que os neutrófilos induziram apoptose de células endoteliais, a qual pode ser prevenida com o uso de antioxidantes (como o ácido ascórbico e tocoferol) e inibidores de enzimas proteolíticas *in vitro*.

#### 2.4– POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA N-ACETILCISTEINA

A N-acetilcistina (NAC) é usada principalmente como agente mucolítico e antídoto em casos de intoxicação pelo paracetamol (acetaminofeno), reduzindo o grau de lesão hepática e sendo bastante efetiva quando administrada previamente dentro de 8 a 10 horas após a intoxicação. A proteção hepática mediada por NAC provavelmente ocorre pela manutenção ou restauração dos níveis de GSH ou que NAC deve atuar como um substrato alternativo por conjugação com as ROS para detoxificá-las (DAWSON *et al.*, 1989; JONES, 1998).

A NAC é um fármaco amplamente usado e seguro. Além disso, pode ser benéfico na malária grave, tais como malária cerebral e pulmonar, através do sequestro de ROS, diminuindo o estresse oxidativo e reduzindo a expressão de receptores endoteliais (CHARUNWATTHANA *et al.*, 2009).

Em relação às propriedades farmacocinéticas, a NAC é rapidamente absorvida após a administração via oral, tanto em humanos quanto em animais. A máxima concentração plasmática é atingida em 2 a 3 horas após a administração e a meia-vida plasmática é de 5 a 6 horas em adultos e 11 horas em neonatos. No entanto, sofre extensivo metabolismo hepático, resultando em baixa biodisponibilidade (DEKHUIJZEN, 2004).

NAC é uma molécula doadora de grupo sulfidril com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (MAJANO *et al.*, 2004). Assim, NAC exibe propriedades antioxidantes diretas e indiretas. O grupo tiol livre de NAC é capaz de interagir com os grupos eletrófilos de ROS do metabolismo respiratório e da resposta imune, levando a formação de substâncias menos reativas, sendo NAC dissulfeto o maior produto. Além disso, NAC exerce um efeito antioxidante indireto relacionado ao seu papel como precursor da glutatona (GSH). Em situações de estresse oxidativo, os níveis de GSH podem decair drasticamente. No entanto, a administração de NAC demonstrou reestabelecer a ressíntese de GSH via desacetilação intracelular da NAC fornecendo cisteína, o principal aminoácido da molécula de GSH. Dados de estudos *in vivo* e *in vitro* também mostram que NAC protege o pulmão de agentes tóxicos pelo aumento dos mecanismos de defesa pulmonar através de suas propriedades antioxidantes diretas e indiretas, como precursor da síntese da GSH (DEKHUIJZEN, 2004).

A perda da deformidade de hemácias parasitadas e não parasitadas pelo Plasmodium é conhecida durante a infecção e a NAC é considerada efetiva para reverter este processo. Além disso, pode inibir a liberação de TNF- $\alpha$  e é um potente varredor de ROS, produzidos em resposta ao TNF- $\alpha$  (MOHANTY *et al.*, 2006).

Apesar de alguns estudos sugerirem que a administração de NAC é segura como tratamento adjuvante com o uso de artesunato, existem outros que mostram que NAC pode antagonizar parcialmente a ação antimalárica do artesunato *in vitro* (TREEPRASERTSUK *et al.*, 2003; ARREESRISOM *et al.*, 2007). De fato, Charunwatthana *et al.* (2009) estudaram a eficácia e segurança de NAC parenteral como um tratamento adjuvante na malária grave causada por *P. falciparum* em pacientes tratados com artesunato e mostraram que apesar do nível de estresse oxidativo esteja aumentado na malária grave, não foram observados efeitos benéficos do uso de NAC nesses pacientes.

A utilização da NAC no tratamento adjuvante da malária falciparum, associada à terapia antimalárica, deve ser cuidadosamente avaliada, pois o mecanismo de ação de alguns antimaláricos, tais como a artemisina e artesunato, baseiam-se no estresse oxidativo ao parasita, tendo o NAC um efeito antagonista a esse tipo de antimalárico e levando a efeitos adversos (ARREESRISOM *et al.*, 2007; CHARUNWATTHANA *et al.*, 2009).

Majano *et al.* (2004) estudaram os efeitos de NAC na indução da síntese de NO em hepatócitos humanos em resposta à citocinas pro-inflamatórias. Os resultados mostraram que NAC modulou a indução da síntese de NO, a liberação de nitritos e a formação de complexos de ligação ao fator nuclear kappa B (NF-κB) em hepatócitos tratados com citocinas. Estes dados sugeriram que a exposição de hepatócitos a NAC resultou em modulação da expressão de NO sintetase e atividade de NF-κB, a resposta chave dos hepatócitos à citocinas pro-inflamatórias. Estes dados constituem evidências preliminares de que NAC pode ter ação hepatoprotetora de relevância potencial em doenças hepáticas inflamatórias, mediada, parcialmente, através da modulação da síntese de NO.

## 2.5- POTENCIAL ANTIOXIDANTE E MEDICINAL DO COGUMELO *Agaricus sylvaticus*

O cogumelo descrito como *Agaricus sylvaticus* foi identificado por Heinemann como *Agaricus blazei* Murril em 1993. Anos mais tarde, Wasser *et al.* (2002) em um estudo morfológico comparativo minucioso, demonstraram que *A. blazei* Murril trata-se da mesma espécie denominada pelos autores de *Agaricus brasiliensis*. Assim, à luz deste conhecimento, o nome *Agaricus brasiliensis* substituiria as denominações anteriores usadas para esta importante espécie de cogumelo, no entanto, alguns autores acreditam que a denominação mais adequada seria *Agaricus sylvaticus*. Nesse sentido, qualquer das denominações seguintes referem-se à *Agaricus sylvaticus*.

O *Agaricus blazei* Murril (Agaricaceae), uma espécie nativa do Brasil, popularmente conhecida como “cogumelo do sol” (ou “Himematsutake” no Japão) têm sido foco de estudo devido aos seus possíveis propriedades farmacológicas (BARBISAN *et al.*, 2002; FIRENZUOLI *et al.*, 2008), sendo amplamente cultivado no Japão para uso medicinal, tanto que é hoje considerado uma das mais importantes espécies comestíveis com propriedades medicinais.

Tradicionalmente, este cogumelo tem sido utilizado no tratamento de muitas doenças, tais como bacterianas e parasitárias (MIZUNO *et al.*, 1995; WASSER e WEIS, 1999), estresse físico e emocional, estimulante do sistema imune, bem como para a melhoria da qualidade de vida de diabéticos, redução do

colesterol, prevenção de osteoporose e úlcera péptica, dermatites, hepatite, doenças cardíacas, além do tratamento de problemas digestivos, circulatórios, combate ao câncer (MIZUNO *et al.*, 1995; FIRENZUOLI *et al.*, 2008; KASAI *et al.*, 2004; YUMINAMOUCHI, 2007) e tratamento da AIDS (HUANG e MAU, 2006). A figura 8 mostra os corpos de frutificação de *Agaricus sylvaticus* em dois estágios de maturidade.



Figura 8: Corpo de frutificação (basidiocarpos) de *Agaricus sylvaticus* em dois estágios de maturidade: jovem (YB) e maduro (MB; SOARES *et al.*, 2009).

Nesse sentido, Barros *et al.* (2008) estudaram a atividade antioxidante de cinco fungos do gênero *Agaricus* através de técnicas químicas, bioquímicas e eletroquímicas, encontrando que todas as espécies fornecem uma atividade antioxidante, sendo que o *Agaricus sylvaticus* foi a espécie que apresentou a maior atividade.

Posteriormente, Percário *et al.* (2009) pesquisaram o potencial antioxidante *in vitro* de diferentes apresentações de *Agaricus sylvaticus*, empregando a avaliação da curva dose-resposta do estado antioxidante total para os radicais 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-ácido-6-sulfônico-diamônio (ABTS<sup>+</sup>) e 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH). Além disso, o teor de fenóis totais,  $\beta$ -glucanas e flavonóides totais foram testados nas apresentações de suspensão líquida e comprimidos do *A. sylvaticus*. Os autores verificaram que todas as amostras testadas apresentaram alta capacidade antioxidante proporcional à concentração e

uma inibição de 100% da produção de ROS com valores extremamente baixos de massa do fungo.

Segundo Nagata *et al.* (2001) as  $\beta$ -glucanas são polissacarídeos amplamente conhecidos como modificadores da resposta biológica, apresentando funções farmacológica-ímmunes atribuídas a estimulação da imunidade mediada por células. Desse modo, avaliaram a expressão de NO e IL-1 $\beta$  de macrófagos peritoneais de ratos não-tratados com  $\beta$ -glucanas extraídas de *Agaricus blazei* Murril na estimulação com compostos que podem ser usados farmacologicamente para aumentar a resposta ímune. Os resultados mostraram que *Agaricus blazei* induziu a produção de NO dose-dependente e produção de IL-1 $\beta$  apenas em altas concentrações, sugerindo a ativação de macrófagos e células B.

Sorimachi *et al.* (2001) examinaram componentes fracionados de *Agaricus blazei* com etanol para determinar se induzem a secreção de NO e citocinas por macrófagos *in vitro* e verificaram aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IL-8 e NO por macrófagos, concluindo que o *Agaricus blazei* Murril contém componentes que ativam macrófagos, contribuindo para o sistema ímune *in vitro*. De fato, Kasai *et al.* (2004) comprovaram que *Agaricus blazei* possui também um potencial para ativar macrófagos imaturos e promover uma resposta Th1 nos tecidos.

Kuo *et al.* (2002) avaliaram a ação imunomoduladora do *Agaricus blazei* Murill usando células mononucleares do sangue periférico (PBMC), incluindo linfócitos T. Avaliaram-se os efeitos das frações ativas de *Agaricus sylvaticus* na proliferação de PBMC, produção de NO, expressão de genes de citocinas e progressão do ciclo celular. Os resultados mostraram um aumento na produção de mRNA de iNOS e produção de NO em PBMC por estimulação da fitohemaglutinina.

Diversos estudos abordam o uso de antioxidantes para melhorar a resposta do hospedeiro durante a infecção pelo *Plasmodium*, no entanto, a literatura não dispõe de artigos sobre envolvimento do *Agaricus sylvaticus* na terapia adjuvante da malária. De todo modo, por todos esses aspectos aqui discutidos em relação às ações antioxidantes e antimicrobianas desse cogumelo, bem como das suas ações como modulador da resposta ímune, é possível que as substâncias antioxidantes nele contidas possam restabelecer o equilíbrio redox e, desse modo, interferir na internalização do *Plasmodium* nos eritrócitos tanto em modelos experimentais como em humanos, dificultando o estabelecimento da doença ou diminuindo sua gravidade.

### 3- OBJETIVOS

#### 3.1 – OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da suplementação com antioxidantes sobre as alterações oxidativas em modelo experimental de malária causada pelo *Plasmodium berghei*.

#### 3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as alterações do estado redox (ROS e antioxidantes) a nível cerebral e pulmonar, induzidas na infecção causada pelo *Plasmodium berghei*;
- Estimar o potencial benefício da suplementação com antioxidantes sobre as alterações oxidativas;
- Comparar os efeitos antioxidantes da N-acetilcisteína e do *Agaricus sylvaticus* na evolução da doença;
- Avaliar a existência de correlação entre estresse oxidativo, defesa antioxidante total e parasitemia dos animais no tecido cerebral e pulmonar;
- Comparar o comportamento oxidativo e da defesa antioxidante cerebral com a pulmonar.

#### 4- METODOLOGIA

Neste estudo, foram utilizados 200 camundongos machos da espécie *Mus musculus* (swiss), adultos jovens, procedentes do Instituto Evandro Chagas (IEC) – Belém-PA. Os animais foram divididos randomicamente em 20 grupos e, ao final do estudo, amostras de tecido pulmonar, cerebral e sangue foram coletadas para avaliação dos marcadores do estresse oxidativo, da defesa antioxidante e grau de parasitemia, como segue:

**Grupos I-V (Controles Positivos):** (N=10 cada), os animais foram inoculados com eritrócitos infectados com *P. berghei* e receberam simultaneamente solução salina fisiológica (0,85%; 0,4 mL/Kg peso corporal; gavagem), e foram submetidos à eutanásia, de acordo com o período de estudo.

**Grupos VI-X (Controles Negativos):** (N=10 cada), correspondem aos animais que não foram inoculados com eritrócitos infectados com *P. berghei*, no entanto, receberam solução salina fisiológica (0,85%; 0,4 mL/Kg peso corporal; Intraperitoneal) antes do período de estudo.

**Grupos XI-XV:** (N=10 cada), os animais foram inoculados com *P. berghei* e tratados simultaneamente com N-acetilcisteína (NAC; solução aquosa 5%; 0,4 mL/Kg peso corporal; gavagem). Foram administrados 100 µl de NAC por 20 g de peso do animal duas horas antes da inoculação do *P. berghei* e, diariamente até o dia determinado para a eutanásia dos animais.

**Grupos XVI-XX:** (N=10 cada), os animais foram inoculados com *P. berghei* e tratados simultaneamente com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* (solução aquosa 1%; 0,2 mL/Kg peso corporal; gavagem). Foram administrados 100 µl de *Agaricus sylvaticus* por 20 g de peso do animal duas horas antes da inoculação do *P. berghei* e, diariamente até o dia da eutanásia dos animais.

Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Federal do Pará (UFPA) em gaiolas contendo cinco animais cada (Figura 9). O período de estudo foi de 1, 3, 5, 7 e 10 dias, respectivamente, para todos os grupos e, ao final de cada período, os animais foram submetidos a administração de heparina via intraperitoneal (Sulfato de heparina 100 UI i.p.) e anestesiados intraperitonealmente com 50 µL de Ketamina (5%)-Xilazina (2%) e submetidos à eutanásia por exanguinação (hipovolemia) para obtenção das amostras.

Após toracotomia (Fig. 10), as amostras de sangue foram obtidas por punção sanguínea do ventrículo direito do coração do camundongo (Fig. 11), bem como ambos os pulmões foram removidos. O cérebro foi obtido após craniotomia.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa com Animais de Experimentação - CEPAE/UFGA, conforme parecer em anexo.



Figura 9- Acondicionamento dos camundongos *Mus musculus*.

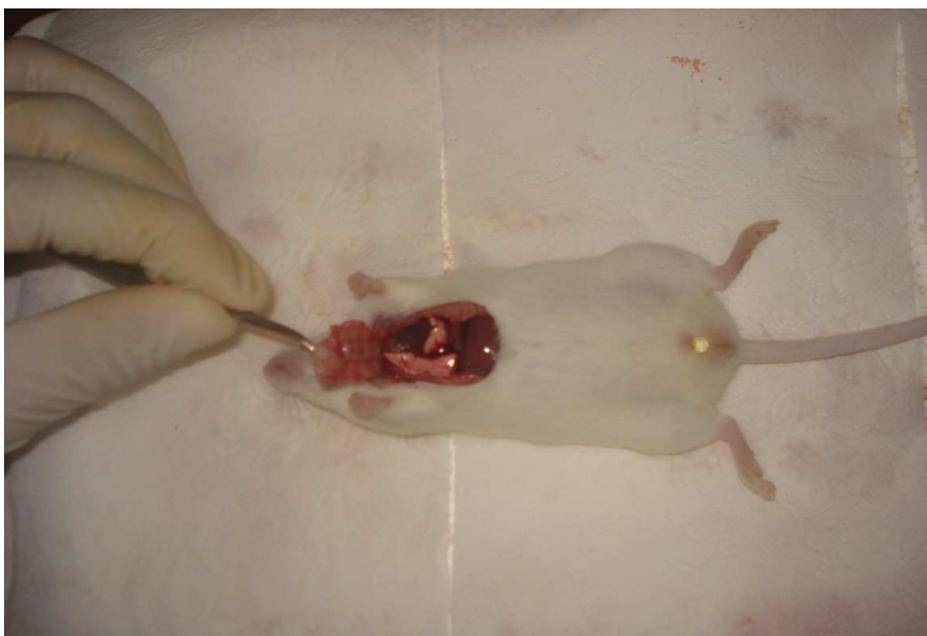


Figura 10- Toracotomia de camundongos *Mus musculus* para a coleta amostra sanguínea.



Figura 11- Punção cardíaca em camundongos *Mus musculus* para coleta de amostra sanguínea.

#### 4.1- INDUÇÃO DA MALÁRIA NOS ANIMAIS

Os camundongos foram induzidos à malária através da inoculação intraperitoneal de  $10^6$  hemácias infectadas pelo *Plasmodium berghei* ANKA, diluídas em 0,2 mL de solução salina estéril. A cepa de *P. berghei* foi fornecida pelo Laboratório de Neuroquímica da UFPA. Após a inoculação das hemácias infectadas, os camundongos foram acondicionados em gaiolas para cinco animais e mantidos com ração e água “*ad libitum*” por todo o período de estudo.



Figura 12- Inoculação intraperitoneal de hemácias infectadas com o *P. berghei* ANKA em camundongos *Mus musculus*.

#### 4.2 – HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS

Amostras do tecido cerebral e pulmonar foram coletadas para avaliação da capacidade antioxidante total e marcadores do estresse oxidativo. Assim, as amostras foram pesadas e acrescidas de solução tampão salina fosfato (PBS) na proporção 1:10 (m:v). Na sequência, em um copo béquer em que foram pesadas, as amostras foram picotadas com tesoura de ponta fina, para produzir fragmentos menores, com a finalidade de facilitar a homogeneização. O processo de homogeneização foi realizado em um disruptor de células ultrassônico (Thornton, D. Cel), por quatro minutos após a sintonização da agulha de homogeneização, estando o aparelho selecionado na potência de 10W. Durante o processo, o copo béquer contendo o material foi mantido em gelo picado, para evitar que o calor produzido no processo comprometesse a viabilidade das amostras. O homogeneizado foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado em freezer à temperatura de -20°C para análise posterior.



Figura 13- Disruptor celular ultrassônico para homogeneização das amostras de tecido pulmonar e cerebral.

#### 4.3- DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA

Com o propósito de verificar o grau de parasitemia, foram realizados esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa, contando-se, em um total de 200 hemácias, o número de hemácias parasitadas. A razão entre o número de hemácias parasitadas e o número de hemácias contadas (200) foi considerada como o grau de parasitemia. A leitura das lâminas foi realizada no microscópio óptico com objetiva de 100x.

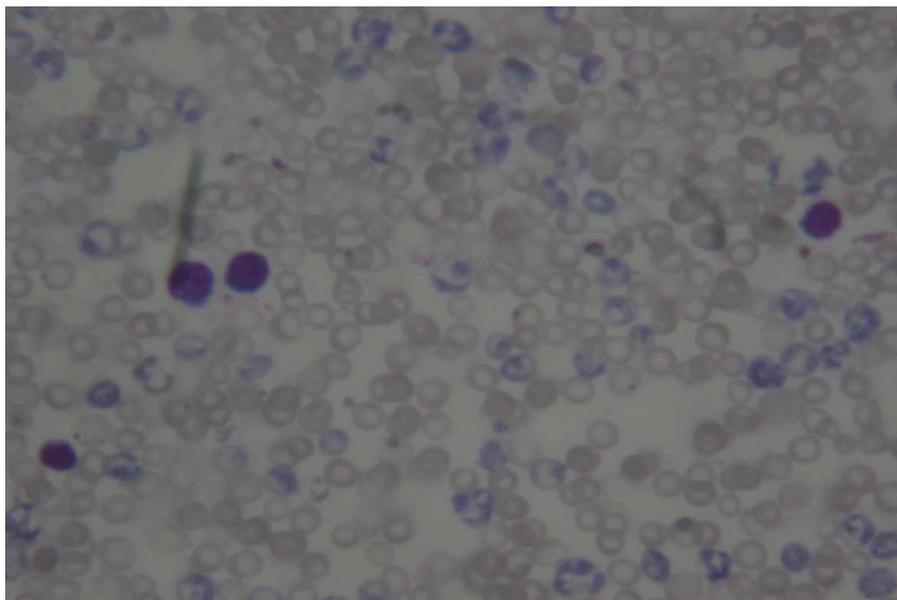


Figura14- Esfregaço sanguíneo de camundongos infectados pelo *P. berghei* corado pelo método de Giemsa, em microscópio óptico com aumento de 1000x.

#### 4.4- PROCEDIMENTO TÉCNICO:

##### 4.4.1- Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TEAC)

A capacidade antioxidante total foi determinada de acordo com a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox<sup>®</sup> (TEAC). O trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical Co 23881-3) é um potente antioxidante análogo hidrossolúvel da vitamina E. Seguiu-se o método proposto por Miller *et al.* (1993) modificado por Re *et al.* (1999) em condições adaptadas de temperatura, proporções relativas dos reagentes e tempo de mensuração. Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (Sigma A1888) com persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), produzindo diretamente o radical cátion  $ABTS^{*+}$ , cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorvância lida a 734nm em intervalo de tempo de cinco minutos. Assim, a extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion  $ABTS^{*+}$  é determinada como a atividade antioxidante total da amostra, sendo então calculada

a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições. Os resultados finais foram expressos em micromoles por litro ( $\mu\text{M/L}$ ) correspondente à concentração do trolox com capacidade antioxidante equivalente à da amostra testada, padrão de medida este denominado TEAC.

#### **4.4.2- Dosagem do Malondialdeído (MDA)**

O MDA, um peróxido lipídico, pode ser utilizado como um indicador do estresse oxidativo. A determinação foi realizada segundo o método proposto por Khon e Liversedge (1944), modificado por Percário *et al.* (1994). Esta técnica baseia-se na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, formando o complexo MDA-TBA de cor rósea, com absorvância em 535 nm.

#### **4.4.3- Dosagem do Óxido Nítrico (NO)**

Grande parte do NO liberado na corrente sanguínea deveria ser varrido pela hemoglobina nos eritrócitos ou convertido a Nitrito ( $\text{NO}^{\cdot-}_2$ ) na presença de oxigênio molecular. O nitrito reage com a oxihemoglobina, levando a formação de nitrato ( $\text{NO}^{\cdot-}_3$ ) e metemoglobina. Em função de sua estabilidade, o  $\text{NO}^{\cdot-}_2$  tem sido amplamente utilizado para confirmar a existência prévia de NO (MAY *et al.*, 2000). Assim, a avaliação deste parâmetro foi realizada através do método de ELISA, utilizando-se o Kit Total NO/Nitrite/Nitrate (R & D Systems, Cat. # KGE001). Esta técnica baseia-se na determinação quantitativa de NO total, envolvendo a enzima nitrato redutase, que converte nitrato a nitrito, seguido pela detecção colorimétrica de nitrito como um produto de cor rosa, produzido pela reação de griess, que absorve luz visível em 540 nm.

#### 4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas, assim como os gráficos, foram realizadas utilizando os programas Microsoft Office Excel 2007 e Biostat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007). Para cada parâmetro analisado foi feita a análise dos possíveis pontos discrepantes (outliers) a qual utiliza em seu cálculo o intervalo interquartil. Portanto, ele é determinado pela diferença entre o terceiro quartil ( $Q_3$ ) e o primeiro quartil ( $Q_1$ ), chamada de  $d_j$ . Considerou-se todo valor menor que  $Q_1 - 3/2 d_j$  ou maior que  $Q_3 + 3/2 d_j$ , como sendo discrepante, não sendo considerado nos cálculos estatísticos.

Foi realizado o teste t de Student para verificar a existência de diferenças significativas para cada parâmetro analisado em cada grupo do início ao final do estudo e na comparação entre os dois tecidos estudados. Para cada parâmetro analisado foi realizada a Análise Variância (ANOVA). Quando se identificou a existência de diferenças significativas, estas foram comparadas entre os grupos, através do teste de Tukey. Para verificação de possível correlação entre parâmetros, foi realizado o teste de correlação de Pearson, considerando-se os valores pareados de dois parâmetros obtidos para um mesmo animal, realizando-se os cálculos com os dados obtidos de todos os animais simultaneamente, independente do grupo a que pertençam. Para os pares de valores em que houve suspeita de relação linear, foi realizada a Análise de Regressão utilizando-se todos os animais de ambos os grupos simultaneamente. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5- RESULTADOS

### 5.1- PARASITEMIA

A figura 15 mostra a evolução da parasitemia de camundongos no grupo controle positivo e nos grupos infectados e suplementados com antioxidantes.

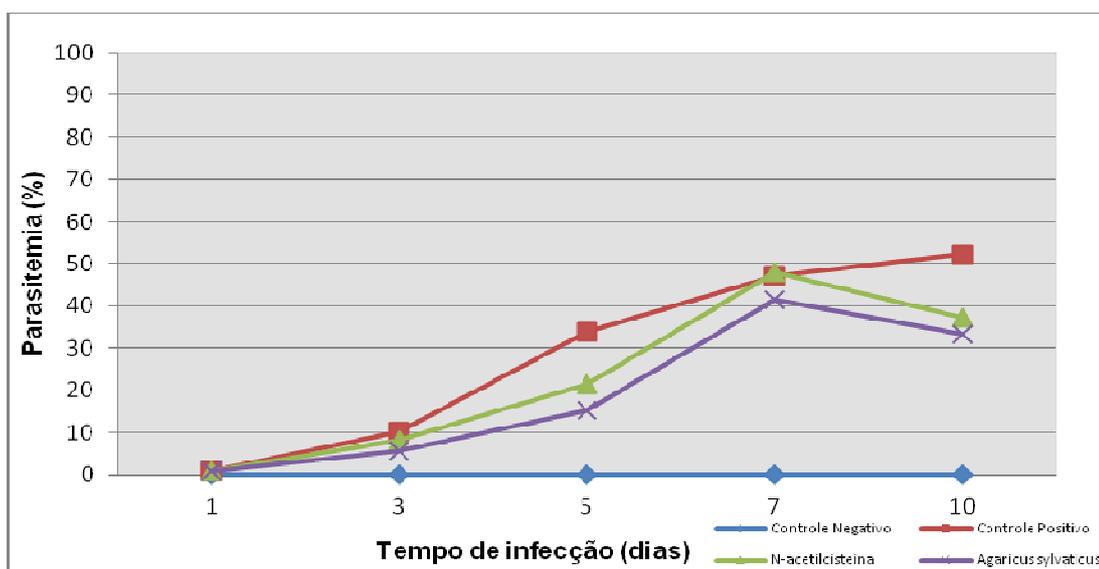


Figura 15- Progressão da parasitemia nos camundongos infectados com *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, comparados ao grupo controle positivo, de acordo com o tempo de infecção.

A parasitemia aumentou em escala temporal para todos os três grupos infectados, sendo que do 7º ao 10º dia de infecção houve uma diminuição ( $p < 0,01$ ) desta nos animais suplementados com NAC e *Agaricus sylvaticus* em relação ao controle positivo.

Tabela 1- Parasitemia média dos grupos de camundongos infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes em função do tempo de infecção.

| Grupo | Parasitemia (%) |                        |                         |            |                         | p valor*                |
|-------|-----------------|------------------------|-------------------------|------------|-------------------------|-------------------------|
|       | 1 dia           | 3 dias                 | 5 dias                  | 7 dias     | 10 dias                 |                         |
| CP    | 1,00±0,47       | 10,30±5,01             | 34,00±2,58              | 47,00±8,91 | 52,14±9,12              | 1,491x10 <sup>-11</sup> |
| NAC   | 1,05±0,49       | 8,30±3,89              | 21,60±7,24 <sup>#</sup> | 48,12±6,71 | 37,33±3,20 <sup>#</sup> | 3,452x10 <sup>-15</sup> |
| AS    | 1,05±0,44       | 5,80±2,30 <sup>§</sup> | 15,33±5,19 <sup>#</sup> | 41,37±9,04 | 33,20±4,09 <sup>#</sup> | 1,681x10 <sup>-12</sup> |

CP: Controle Positivo; NAC: N-acetilcisteína; AS: *Agaricus sylvaticus*. <sup>§</sup>p<0,05xCP; <sup>#</sup>p<0,01xCP. Valores expressos como média±desvio padrão. \*t Student 10dias x 1 dia de infecção.

## 5.2- DOSAGENS PULMONARES

### 5.2.1- Perfil do TEAC

A figura 16 mostra o comportamento da capacidade antioxidante equivalente ao trolox no pulmão dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes no período de estudo de 10 dias. A tabela 2 mostra os valores de TEAC e nível de significância estatística de acordo com os dias de infecção.

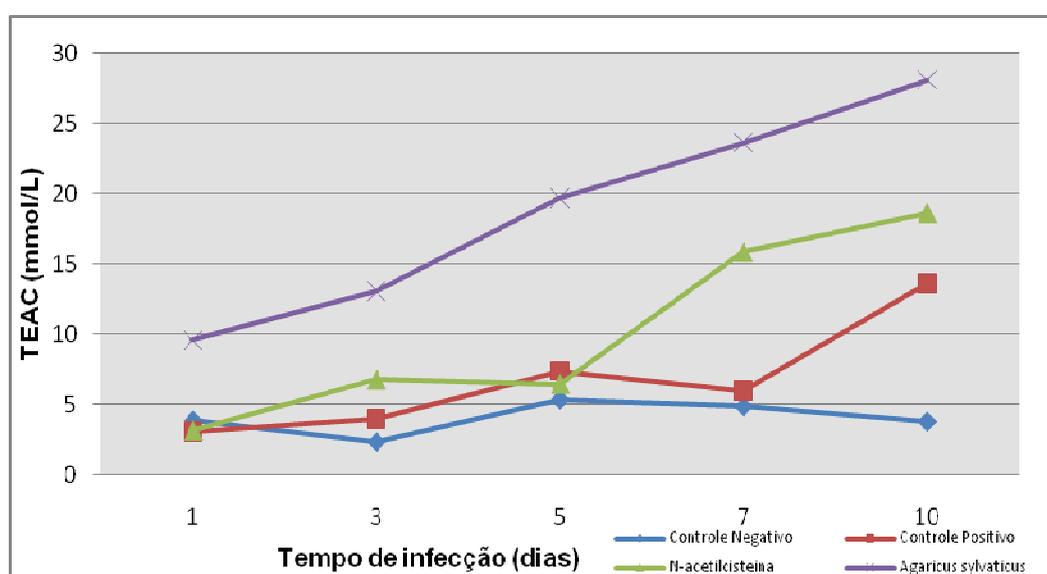


Figura 16 – Comportamento da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar dos animais dos grupos controles e dos grupos infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

O grupo de animais infectados e suplementados com *Agaricus sylvaticus* apresentou elevada capacidade antioxidante total em relação aos outros grupos ( $p < 0,01$ ) durante todo o período de infecção e aumentou de maneira progressiva. Do mesmo modo, o grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína apresentou capacidade antioxidante maior se comparado ao grupo controle negativo no 3º, 7º e 10º dias de infecção ( $p < 0,01$ ) e também ao grupo control e positivo no 3º e no 7º dias ( $p < 0,01$ ).

Tabela 2 – Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção.

| Grupo | TEAC (mmol/L)        |                          |                      |                        |                             | p valor*               |
|-------|----------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|
|       | 1 dia                | 3 dias                   | 5 dias               | 7 dias                 | 10 dias                     |                        |
| CP    | 3,1±0,7 <sup>#</sup> | 4,0±0,7 <sup>##\$%</sup> | 7,4±2,2 <sup>#</sup> | 5,9±0,5 <sup>#\$</sup> | 13,6±4,5 <sup>##&amp;</sup> | 7,283x10 <sup>-6</sup> |
| CN    | 3,9±1,2 <sup>#</sup> | 2,4±1,1 <sup>#\$</sup>   | 5,3±1,5 <sup>#</sup> | 4,8±0,6 <sup>#\$</sup> | 3,8±1,9 <sup>#\$</sup>      | 0,8174                 |
| NAC   | 3,1±1,4 <sup>#</sup> | 6,8±0,7 <sup>#</sup>     | 6,5±1,2 <sup>#</sup> | 15,8±5,0 <sup>#</sup>  | 18,6±3,5 <sup>#</sup>       | 5,401x10 <sup>-9</sup> |
| AS    | 9,6±2,3              | 13,0±1,4                 | 19,7±4,9             | 23,6±2,3               | 28,1±5,8                    | 5,523x10 <sup>-7</sup> |

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; NAC: N-acetilcisteína; AS: *Agaricus sylvaticus*. <sup>#</sup>p<0,01xAS; <sup>\$</sup>p<0,01xNAC; <sup>%</sup>p<0,05xCN; <sup>&</sup>p<0,01xCN . Valores expressos como média±desvio padrão. \*t Student 10dias x 1 dia de infecção.

### 5.2.2- Perfil do MDA

A figura 17 mostra o comportamento do Malondialdeído no pulmão dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes em um período de estudo de 10 dias. A tabela 3 mostra os valores de MDA e nível de significância estatística de acordo com os dias de infecção.

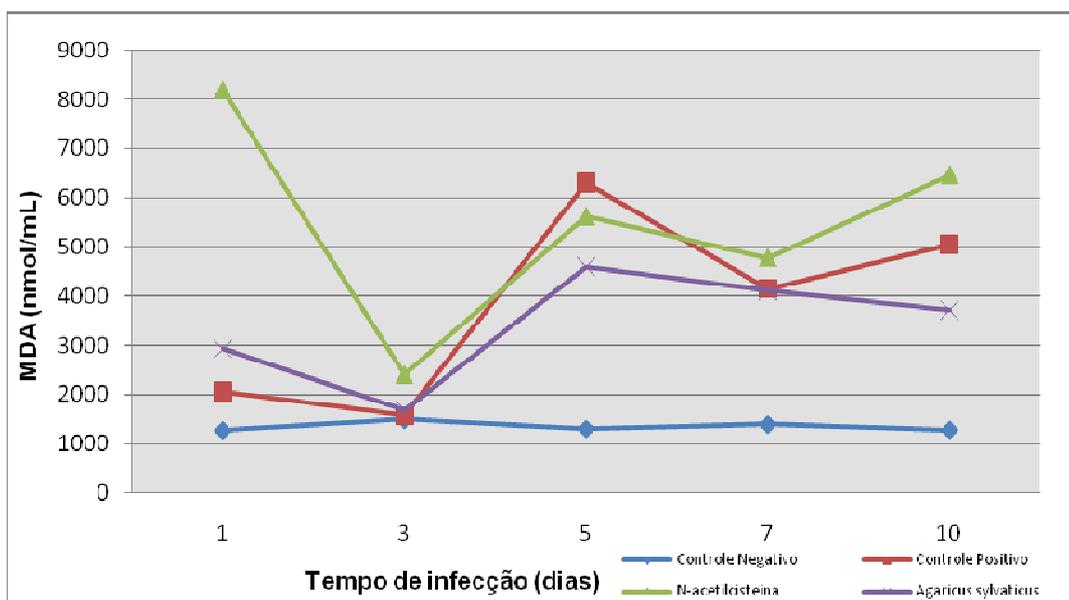


Figura 17- Comportamento do malondialdeído (MDA) pulmonar dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

No grupo de animais infectados (controle positivo), ocorreu um aumento nos níveis de MDA com a progressão da doença ( $p=0,0002$ ) do 1º para o 10º dia de infecção. Da mesma forma, houve correlação significativa nos grupos de infecção nos animais suplementados quando analisamos o 10º dia de infecção *versus* o 3º para os mesmos grupos ( $p=0,0001$  para NAC e  $p=0,002$  para *Agaricus sylvaticus*). Além disso, o grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína apresentou os maiores níveis de MDA em relação ao *Agaricus sylvaticus* no 1º e no 10º dias de infecção ( $p<0,01$ ).

Tabela 3- Malondialdeído (MDA) pulmonar e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção.

| Grupo      | MDA (nmol/mL)          |                       |                         |                         |                           | p valor* |
|------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------|
|            | 1 dia                  | 3 dias                | 5 dias                  | 7 dias                  | 10 dias                   |          |
| <b>CP</b>  | 2063±1240 <sup>#</sup> | 1569±556              | 6307±1913 <sup>\$</sup> | 4152±2679 <sup>\$</sup> | 5051±921 <sup>\$</sup>    | 0,0002   |
| <b>CN</b>  | 1282±133 <sup>#</sup>  | 1498±567 <sup>@</sup> | 1314±401                | 1403±421                | 1292±231                  | 0,9164   |
| <b>NAC</b> | 8181±4184              | 2399±824              | 5613±1749 <sup>\$</sup> | 4778±979 <sup>\$</sup>  | 6456±1868 <sup>\$</sup>   | 0,0001** |
| <b>AS</b>  | 2926±1724 <sup>#</sup> | 1695±752              | 4591±2656 <sup>\$</sup> | 4125±1116 <sup>\$</sup> | 3721±1168 <sup>\$\$</sup> | 0,0020** |

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; NAC: N-acetilcisteína; AS: *Agaricus sylvaticus*. <sup>#</sup>p<0,01xNAC; <sup>@</sup>p<0,05xNAC; <sup>\$</sup>p>0,01xCN. Valores expressos como média±desvio padrão. \*t Student 10 dias x 1 dia de infecção: \*\*t Student 10 dias x 3 dias de infecção .

### 5.2.3- Perfil do NO

A figura 18 mostra o comportamento do Óxido Nítrico no pulmão dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes em um período de estudo de 10 dias. A tabela 4 mostra os valores de NO e nível de significância estatística de acordo com os dias de infecção.

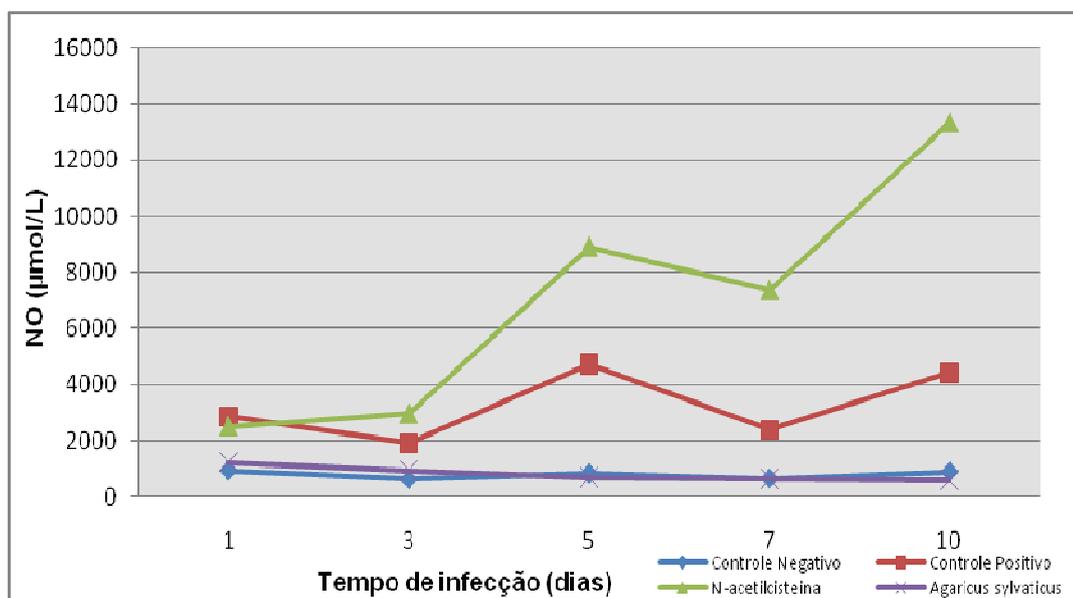


Figura 18- Comportamento do óxido nítrico (NO) pulmonar dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

O grupo de animais infectados (controle positivo) apresentou um aumento significativo nos níveis de NO do 5º ao 10º dias de infecção ( $p < 0,05$ ). Os animais suplementados com N-acetilcisteína apresentaram valores de NO significativamente elevados em relação ao grupo *Agaricus sylvaticus* ( $p < 0,01$ ) do 3º ao 10º dia de estudo e também em relação ao grupo controle positivo do 5º ( $p < 0,05$ ) ao 10º dia de infecção ( $p < 0,01$ ). Por outro lado, os grupos de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* apresentaram níveis de NO semelhantes aos dos grupos controle negativo.

Tabela 4 – Óxido Nítrico (NO) pulmonar e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção.

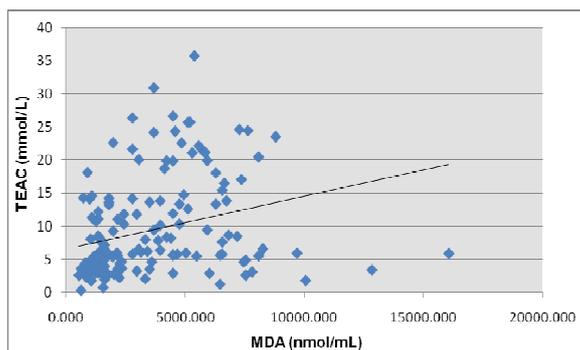
| Grupo      | NO ( $\mu\text{mol/L}$ ) |                            |                              |                              |                              | p valor* |
|------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------|
|            | 1 dia                    | 3 dias                     | 5 dias                       | 7 dias                       | 10 dias                      |          |
| <b>CP</b>  | 2856 $\pm$ 961           | 1907 $\pm$ 1535            | 4719 $\pm$ 3464              | 2379 $\pm$ 1695 <sup>#</sup> | 4419 $\pm$ 1922 <sup>#</sup> | 0,0783   |
| <b>CN</b>  | 952 $\pm$ 176            | 628 $\pm$ 126 <sup>#</sup> | 834 $\pm$ 367 <sup>#§</sup>  | 663 $\pm$ 99 <sup>#§</sup>   | 906 $\pm$ 312 <sup>#§</sup>  | 0,7039   |
| <b>NAC</b> | 2516 $\pm$ 2472          | 2955 $\pm$ 1812            | 8906 $\pm$ 3963 <sup>§</sup> | 7369 $\pm$ 1501              | 13340 $\pm$ 8980             | 0,0025   |
| <b>AS</b>  | 1236 $\pm$ 491           | 940 $\pm$ 456 <sup>#</sup> | 701 $\pm$ 382 <sup>#§</sup>  | 648 $\pm$ 158 <sup>#§</sup>  | 608 $\pm$ 173 <sup>#§</sup>  | 0,0171   |

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; NAC: N-acetilcisteína; AS: *Agaricus sylvaticus*. <sup>#</sup>p<0,01xNAC; <sup>§</sup>p<0,05xCP. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. \*t Student 10dias x 1 dia de infecção.

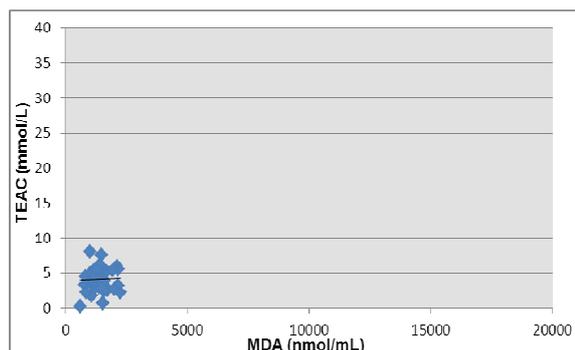
## 5.2.4- Estudo de Correlação em Amostras Pulmonares

### 5.2.4.1- Correlação entre MDA e TEAC

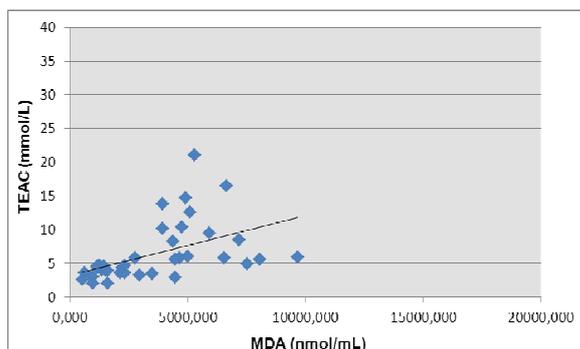
A figura 19 mostra a correlação entre MDA e TEAC nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d, e). A tabela 5 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



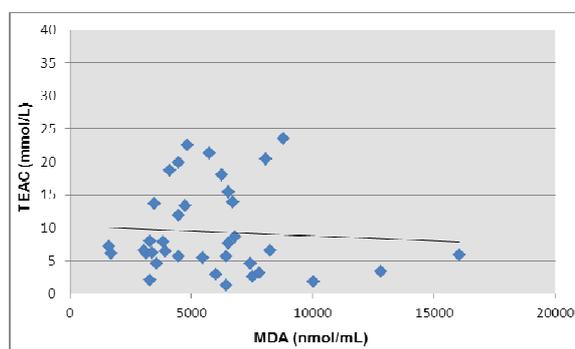
a) Todos os grupos ( $r=0,2868$  e  $p= 0,0003$ )



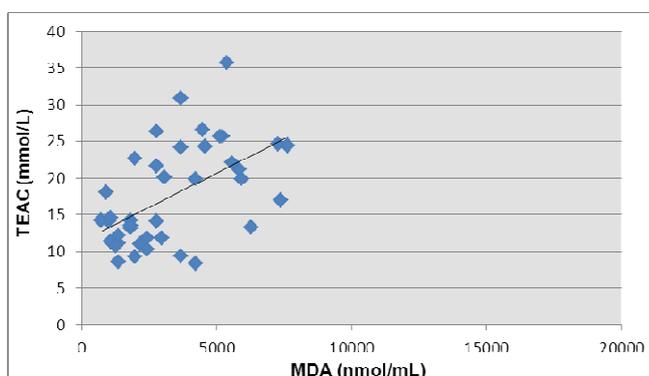
c) Controle negativo ( $r=0,0385$  e  $p=0,7996$ )



b) Controle positivo ( $r= 0,4766$  e  $p=0,0028$ )



d) N-acetilcisteína ( $r=-0,0587$  e  $p=0,7298$ )



e) *Agaricus sylvaticus* ( $r=0,5381$  e  $p=0,0004$ )

Figura 19: Correlação entre Malondialdeído (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

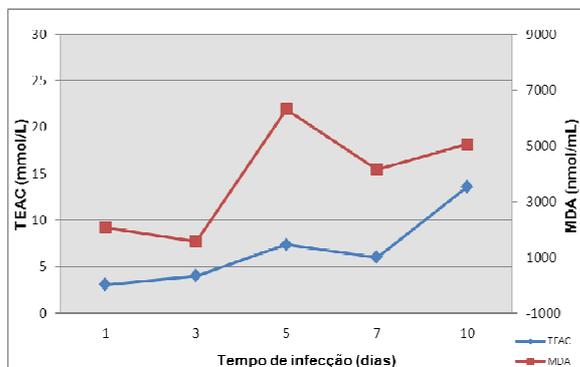
Considerando todos os grupos (a), há uma correlação positiva fraca, porém altamente significativa ( $r= 0,2868$  e  $p=0,0003$ ) entre MDA e TEAC pulmonar. Já no grupo controle positivo (b;  $r= 0,4766$  e  $p =0,0028$ ) e no grupo de animais suplementados com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* (e;  $r= 0,5381$  e  $p= 0,0004$ ), há uma correlação positiva moderada e altamente significativa entre os parâmetros.

Tabela 5 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre MDA e TEAC em amostras pulmonares de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

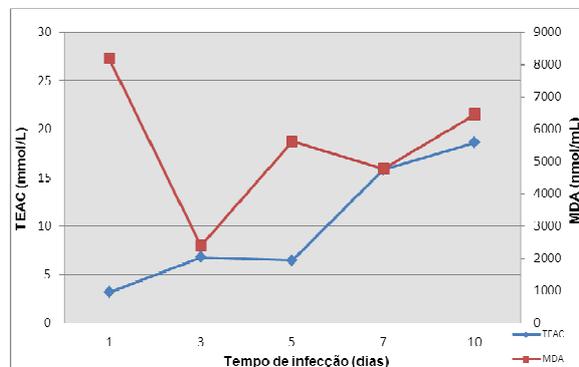
| <b>Grupo</b>               | <b>N</b> | <b>r</b> | <b>p valor</b> |
|----------------------------|----------|----------|----------------|
| Todos os Grupos            | 159      | 0,2868   | 0,0003         |
| Controle Positivo          | 39       | 0,4766   | 0,0028         |
| Controle Negativo          | 46       | 0,0385   | 0,7996         |
| N-acetilcisteína           | 37       | -0,0587  | 0,7298         |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 40       | 0,5381   | 0,0004         |

N= número de amostras; R= Coeficiente de correlação de Pearson.

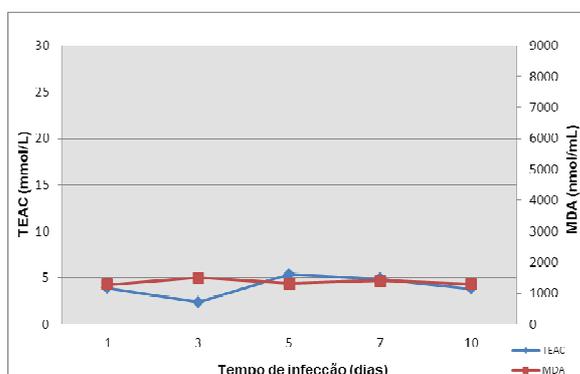
A figura 20 mostra o comportamento de MDA e TEAC pulmonar para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.



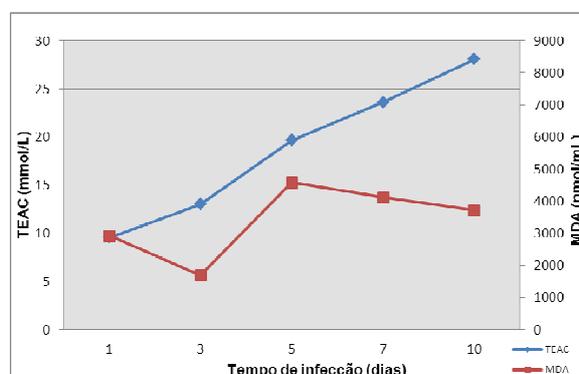
a) Controle positivo



c) N-acetilcisteína



b) Controle negativo

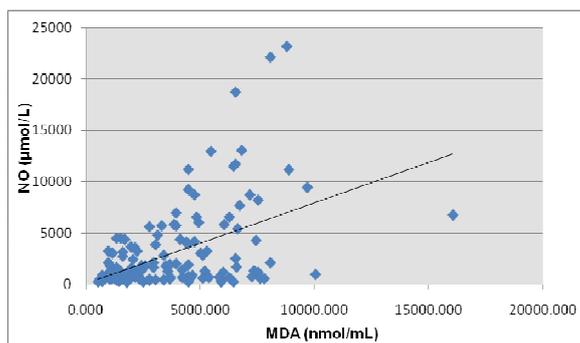


d) *Agaricus sylvaticus*

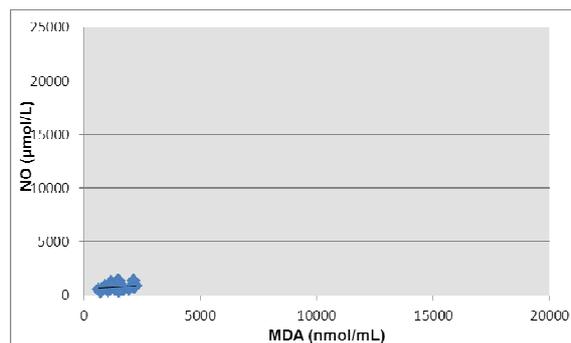
Figura 20- Comportamento de Malondialdeído (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

#### 5.2.4.2- Correlação entre MDA e NO

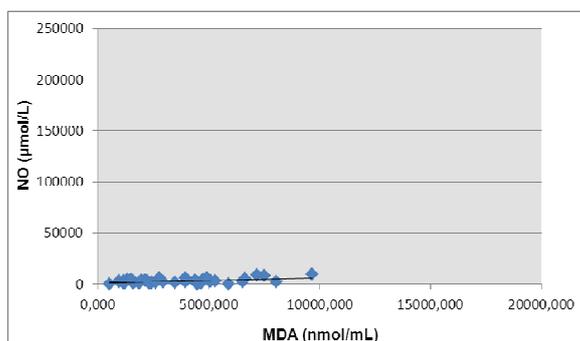
A figura 21 mostra a correlação entre MDA e NO nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d, e). A tabela 6 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



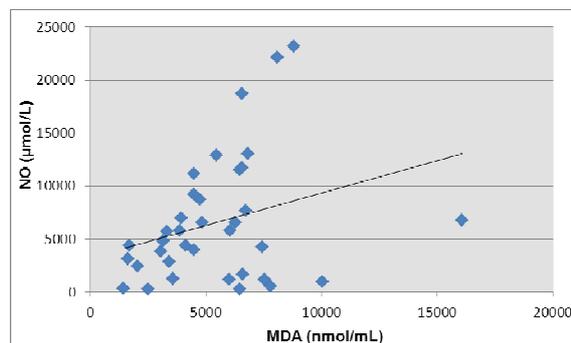
a) Todos os grupos ( $r=0,5095$  e  $p< 0,0001$ )



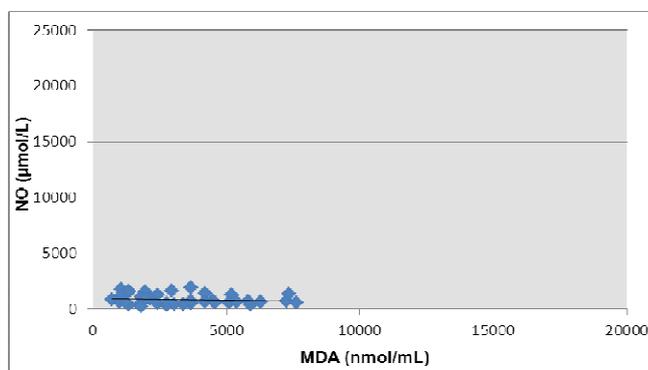
c) Controle negativo ( $r=0,2020$  e  $p=0,2113$ )



b) Controle positivo ( $r=0,5158$  e  $p= 0,0008$ )



d) N-acetilcisteína ( $r=0,2916$  e  $p=0,0843$ )



e) *Agaricus sylvaticus* ( $r=-0,1614$  e  $p=0,3328$ )

Figura 21: Correlação entre Malondialdeído (MDA) e óxido Nítrico (NO) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

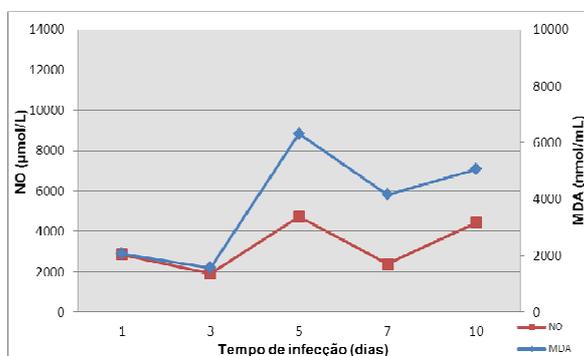
A análise de todos os grupos (a;  $r=0,5095$  e  $p<0,0001$ ) e no controle positivo (b;  $r=0,5158$  e  $p=0,0008$ ) mostrou que há uma correlação positiva moderada e altamente significativa para MDA e NO pulmonar (figura 21).

Tabela 6 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre MDA e NO para cada grupo em amostras pulmonares de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

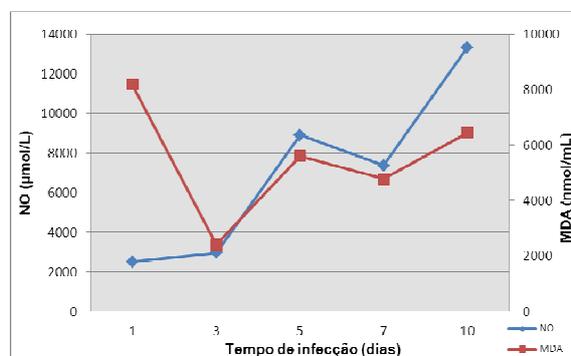
| Grupo                      | N   | r       | p valor  |
|----------------------------|-----|---------|----------|
| Todos os Grupos            | 155 | 0,5095  | < 0,0001 |
| Controle Positivo          | 39  | 0,5158  | 0,0008   |
| Controle Negativo          | 4   | 0,2020  | 0,2113   |
| N-acetilcisteína           | 36  | 0,2916  | 0,0843   |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 38  | -0,1614 | 0,3328   |

N= número de amostras; r= Coeficiente de correlação de Pearson.

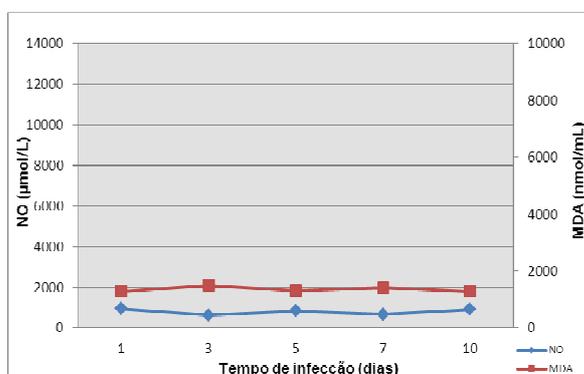
A figura 22 mostra o comportamento de MDA e NO pulmonar para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.



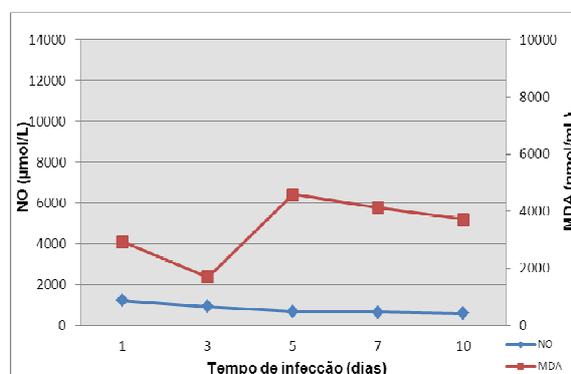
a) Controle positivo



c) N-acetilcisteína



b) Controle negativo

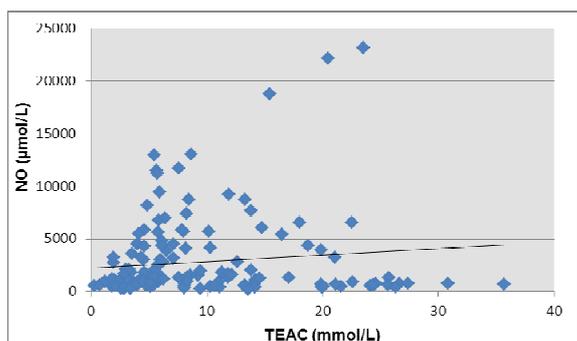


d) *Agaricus sylvaticus*

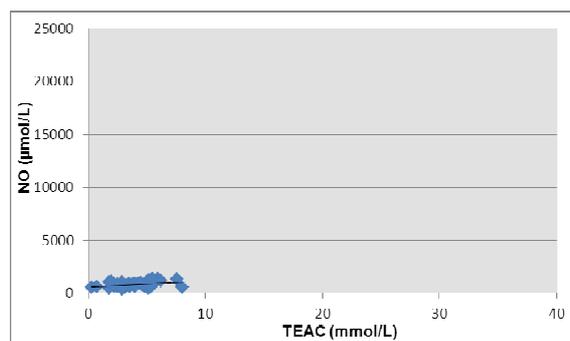
Figura 22- Comportamento de Malondialdeído (MDA) e óxido Nítrico (NO) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

### 5.2.4.3- Correlação entre TEAC e NO

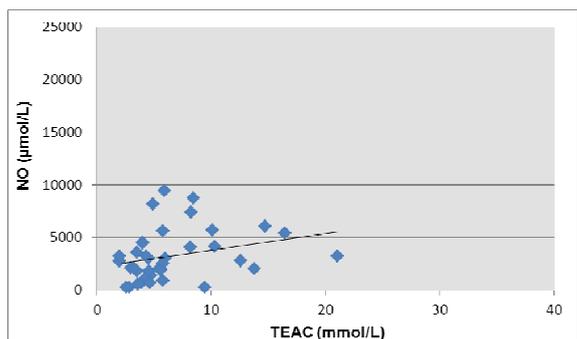
A figura 23 mostra a correlação entre TEAC e NO nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d, e). A tabela 7 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



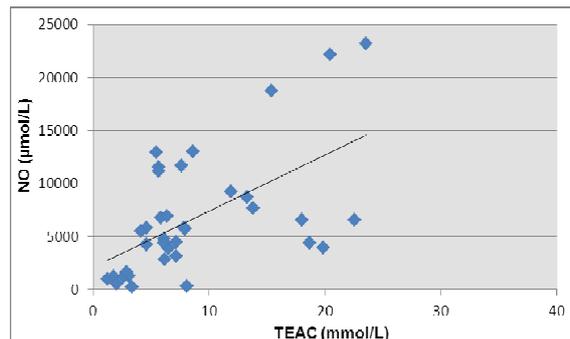
a) Todos os grupos ( $r=0,1147$  e  $p=0,1557$ )



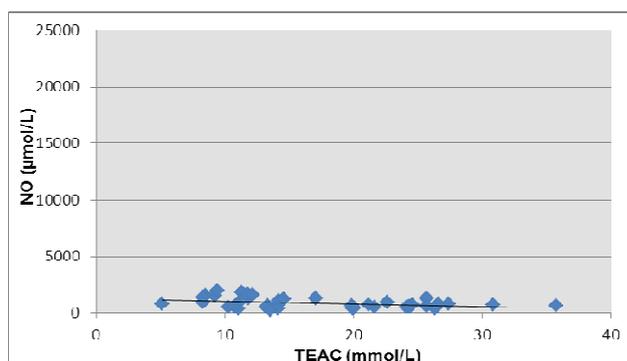
c) Controle negativo ( $r=0,3113$  e  $p=0,0447$ )



b) Controle positivo ( $r=0,2822$  e  $p=0,0905$ )



d) N-acetilcisteína ( $r=0,5769$  e  $p=0,0002$ )



e) *Agaricus sylvaticus* ( $r=-0,3931$  e  $p=0,012$ )

Figura 23: Correlação Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e óxido Nítrico (NO) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

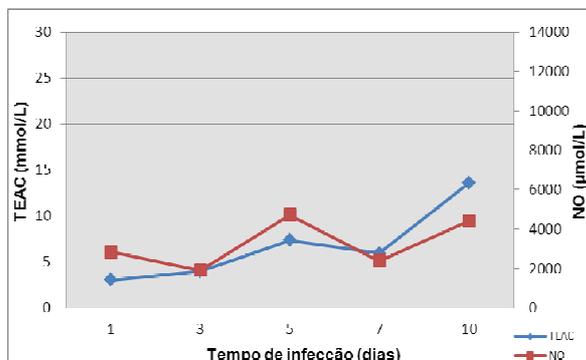
No grupo controle negativo (c;  $r=0,3113$  e  $p=0,0447$ ) ocorreu correlação positiva moderada e significativa. No grupo de animais suplementados com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* (e;  $r=-0,3931$  e  $p=0,012$ ), há uma correlação negativa moderada e significativa entre TEAC e NO. No entanto, no grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína (d), a correlação é positiva moderada e altamente significativa ( $r=0,5769$  e  $p=0,0002$ ) entre TEAC e NO (Figura 23).

Tabela 7 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre TEAC e NO para cada grupo em amostras pulmonares de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

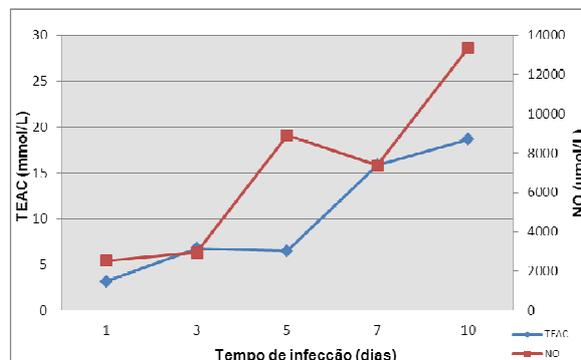
| Grupo                      | N   | r       | p valor |
|----------------------------|-----|---------|---------|
| Todos os Grupos            | 155 | 0,1147  | 0,1557  |
| Controle Positivo          | 37  | 0,2822  | 0,0905  |
| Controle Negativo          | 41  | 0,3113  | 0,0447  |
| N-acetilcisteína           | 37  | 0,5769  | 0,0002  |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 37  | -0,3931 | 0,012   |

N= número de amostras; r= Coeficiente de correlação de Pearson.

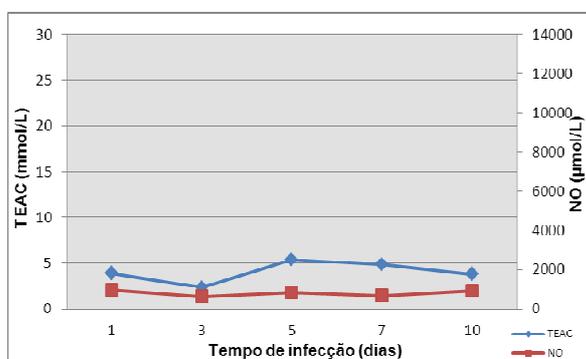
A figura 24 mostra o comportamento de TEAC e NO pulmonar para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.



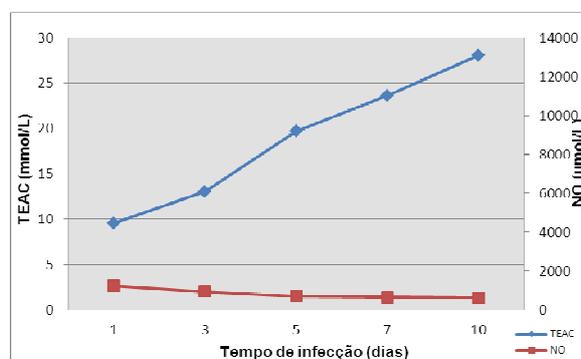
a) Controle positivo



c) N-acetilcisteína



b) Controle negativo

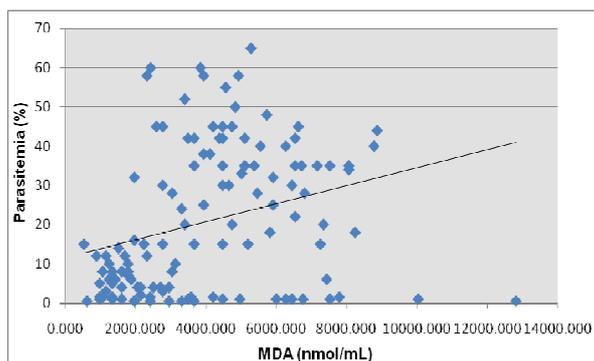


d) *Agaricus sylvaticus*

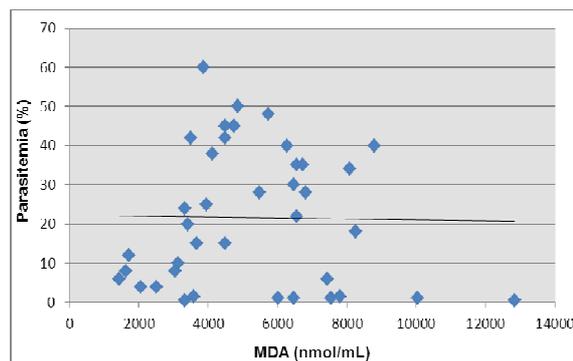
Figura 24- Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e óxido Nítrico (NO) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

#### 5.2.4.4- Correlação entre Parasitemia e MDA

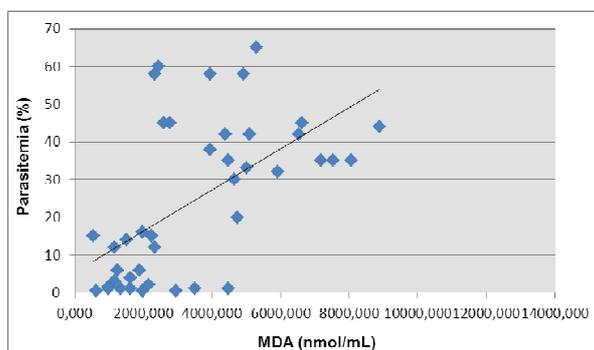
A figura 25 mostra a correlação entre Parasitemia e MDA nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d). A tabela 8 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



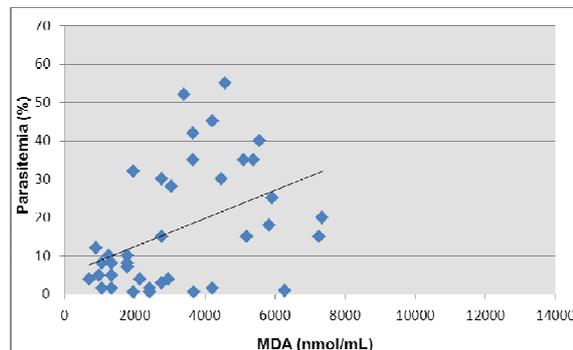
a) Todos os grupos ( $r=0,2204$  e  $p=0,0147$ )



c) N-acetilcisteína ( $r=-0,1235$  e  $p=0,4477$ )



b) Controle positivo ( $r=0,5839$  e  $p<0,0001$ )



d) *Agaricus sylvaticus* ( $r=0,4265$  e  $p=0,0067$ )

Figura 25: Correlação entre Parasitemia e Malondialdeído (MDA) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

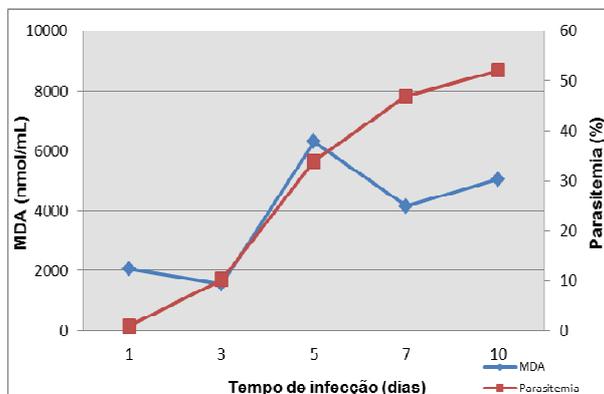
Há uma correlação positiva fraca, porém significativa ( $r=0,2204$  e  $p=0,0147$ ) entre parasitemia e MDA pulmonar, considerando todos os grupos (a). Já no grupo controle positivo (b;  $r=0,5839$  e  $p<0,0001$ ), e no grupo de animais suplementados com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* (d;  $r=0,4265$  e  $p=0,0067$ ), há uma correlação positiva moderada e altamente significativa entre os parâmetros.

Tabela 8 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e significância da correlação entre Parasitemia e MDA para cada grupo nas amostras pulmonares dos camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

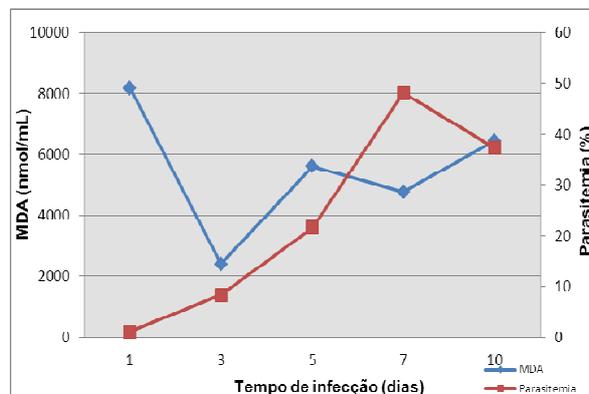
| <b>Grupo</b>               | <b>N</b> | <b><i>r</i></b> | <b><i>p</i> valor</b> |
|----------------------------|----------|-----------------|-----------------------|
| Todos os Grupos            | 121      | 0,2204          | 0,0147                |
| Controle Positivo          | 41       | 0,5839          | <0,0001               |
| N-acetilcisteína           | 40       | -0,1235         | 0,4477                |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 41       | 0,4265          | 0,0067                |

N= número de amostras;  $r$ = Coeficiente de correlação de Pearson.

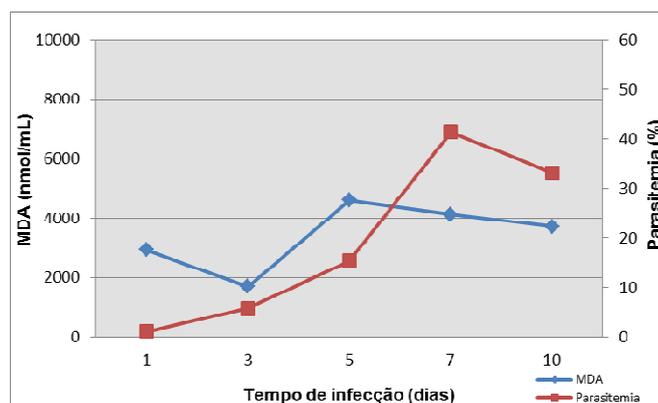
A figura 26 mostra o comportamento da parasitemia e do MDA pulmonar para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.



a) Controle positivo



b) N-acetilcisteína

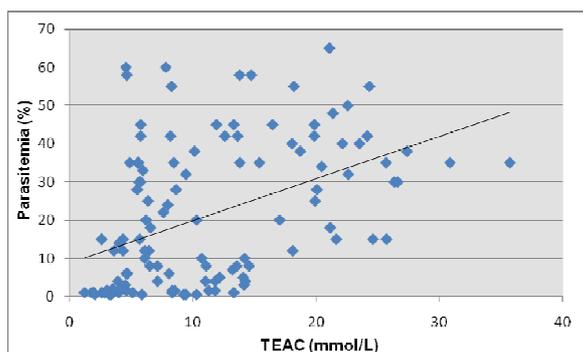


c) *Agaricus sylvaticus*

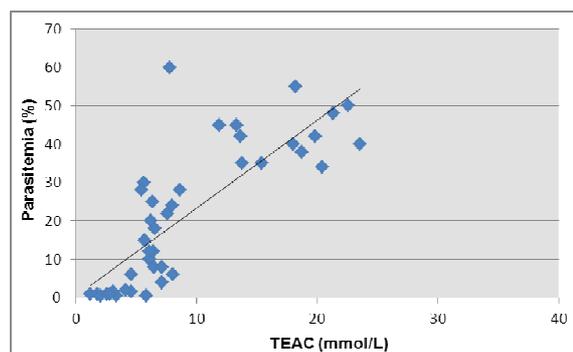
Figura 26: Comportamento da parasitemia e do Malondialdeído (MDA) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

#### 5.2.4.5- Correlação entre Parasitemia e TEAC

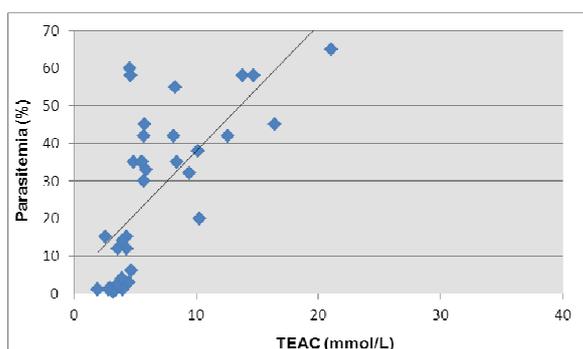
A figura 27 mostra a correlação entre Parasitemia e TEAC pulmonar dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d). A tabela 9 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



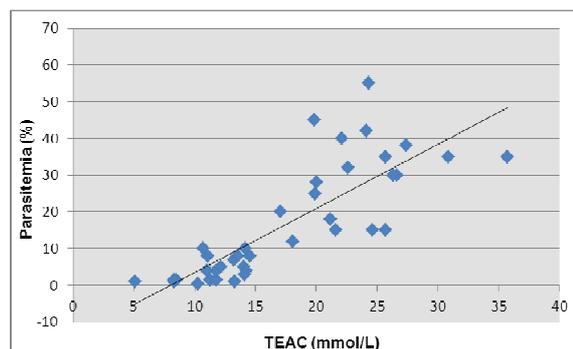
a) Todos os grupos ( $r=0,4515$  e  $p<0,0001$ )



c) N-acetilcisteína ( $r=0,8040$  e  $p<0,0001$ )



b) Controle positivo ( $r=0,6987$  e  $p<0,0001$ )



d) *Agaricus sylvaticus* ( $r=0,8242$  e  $p<0,0001$ )

Figura 27: Correlação entre Parasitemia e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

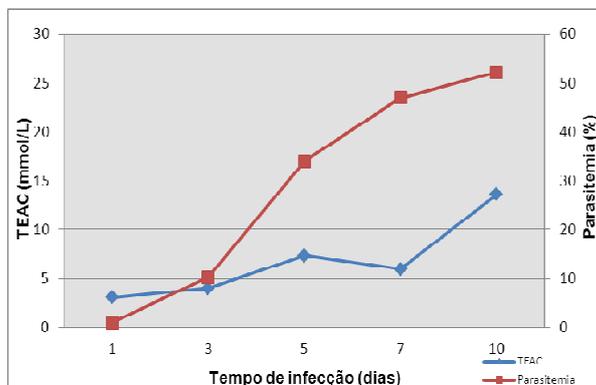
Há uma correlação positiva moderada e altamente significativa ( $r=0,4515$  e  $p<0,0001$ ) entre Parasitemia e TEAC pulmonar, considerando todos os grupos (a). Em todos os grupos individualmente houve uma correlação positiva forte e altamente significativa: (b) controle positivo ( $r=0,6987$  e  $p<0,0001$ ); (c) grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína ( $r=0,8040$  e  $p<0,0001$ ); (d) grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* ( $r=0,8242$  e  $p<0,0001$ ).

Tabela 9 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e significância da correlação entre Parasitemia e TEAC pulmonar dos camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

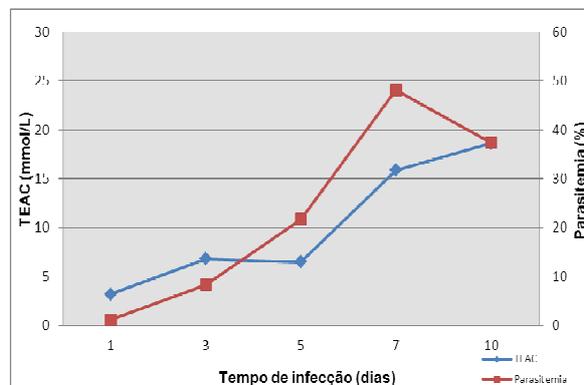
| <b>Grupo</b>               | <b>N</b> | <b><i>r</i></b> | <b><i>p</i> valor</b> |
|----------------------------|----------|-----------------|-----------------------|
| Todos os Grupos            | 118      | 0,4515          | <0,0001               |
| Controle Positivo          | 38       | 0,6987          | <0,0001               |
| N-acetilcisteína           | 41       | 0,8040          | <0,0001               |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 41       | 0,8242          | <0,0001               |

N= número de amostras;  $r$ = Coeficiente de correlação de Pearson.

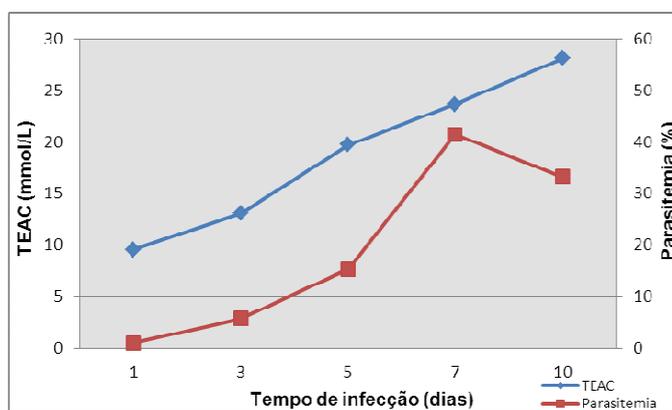
A figura 28 mostra o comportamento da parasitemia e do TEAC pulmonar para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.



a) Controle positivo



b) N-acetilcisteína

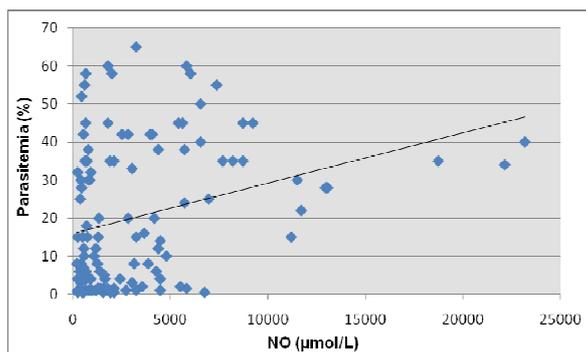


c) *Agaricus sylvaticus*

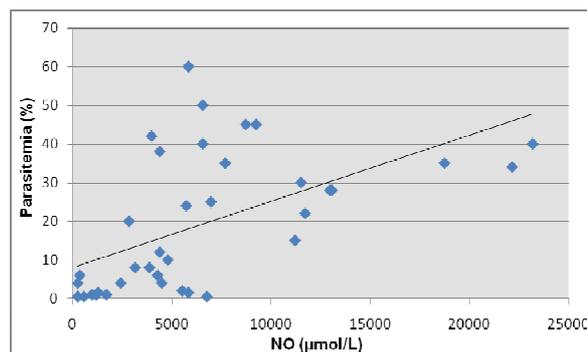
Figura 28: Comportamento da Parasitemia e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

#### 5.2.4.6- Correlação entre Parasitemia e NO

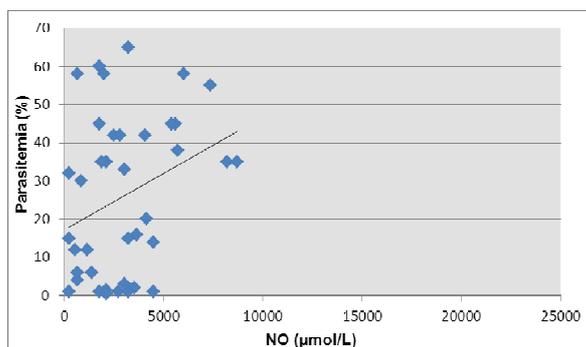
A figura 29 mostra a correlação entre Parasitemia e NO pulmonar dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d). A tabela 10 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



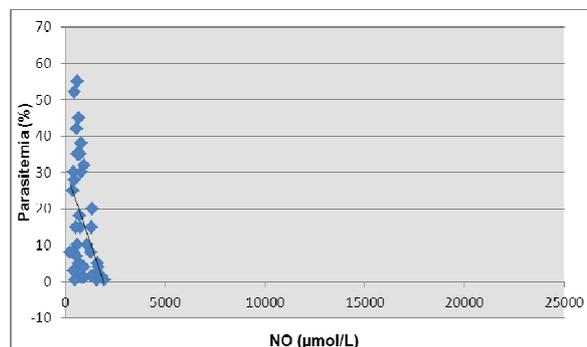
a) Todos os grupos ( $r=0,2957$  e  $p=0,0012$ )



c) N-acetilcisteina ( $r=0,5568$  e  $p=0,0003$ )



b) Controle positivo ( $r=0,3068$  e  $p=0,0574$ )



d) *Agaricus sylvaticus* ( $r=-0,4410$  e  $p=0,0044$ )

Figura 29: Correlação entre Parasitemia e óxido Nítrico (NO) pulmonar dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteina (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

O estudo das correlações mostrou que há uma correlação positiva fraca e altamente significativa ( $r=0,2957$  e  $p=0,0012$ ) entre parasitemia e NO pulmonar, considerando todos os grupos. No grupo controle positivo (b), apesar de não haver significância estatística ( $p=0,0574$ ), parece ser relevante no que se refere ao aumento das concentrações de NO a medida que aumenta a parasitemia. No grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína (c), há uma correlação positiva moderada e altamente significativa ( $r=0,5568$  e  $p=0,0003$ ) entre parasitemia e NO pulmonar. Por outro lado, No grupo de animais suplementados com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* (d), houve uma correlação negativa moderada e altamente significativa ( $r=-0,4410$  e  $p=0,0044$ ) entre os parâmetros.

Tabela 10 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e significância da correlação entre Parasitemia e NO para cada grupo nas amostras pulmonares dos camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

| Grupo                      | N   | $r$     | $p$ valor |
|----------------------------|-----|---------|-----------|
| Todos os Grupos            | 117 | 0,2957  | 0,0012    |
| Controle Positivo          | 39  | 0,3068  | 0,0574    |
| N-acetilcisteína           | 38  | 0,5568  | 0,0003    |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 40  | -0,4410 | 0,0044    |

N= número de amostras;  $r$ = Coeficiente de correlação de Pearson.

A figura 30 mostra o comportamento da parasitemia e do NO pulmonar para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.

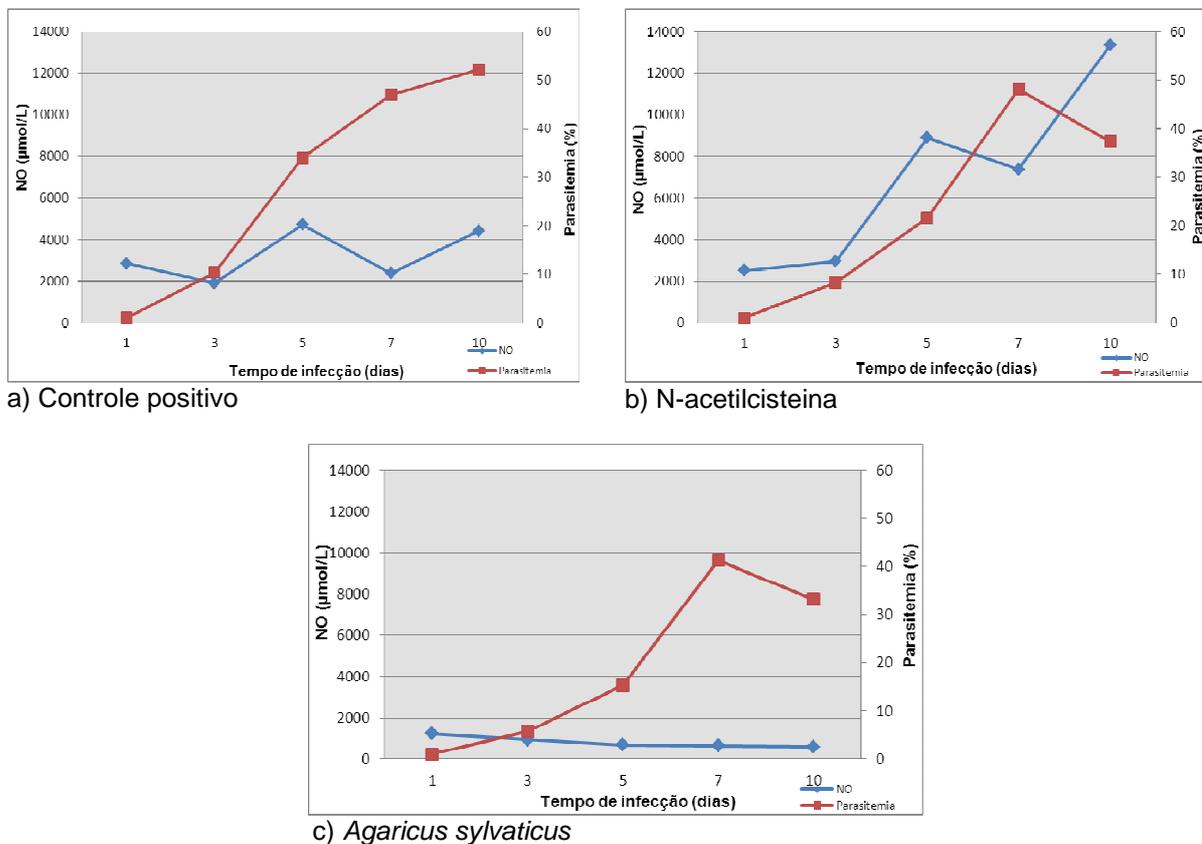


Figura 30: Valores de parasitemia e Óxido Nítrico (NO) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

### 5.3- DOSAGENS CEREBRAIS

#### 5.3.1- Perfil do TEAC

A figura 31 mostra o comportamento da capacidade antioxidante equivalente ao trolox no cérebro dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes em um período de estudo de 10 dias. A tabela 11 mostra os valores de TEAC e nível de significância estatística de acordo com os dias de infecção.

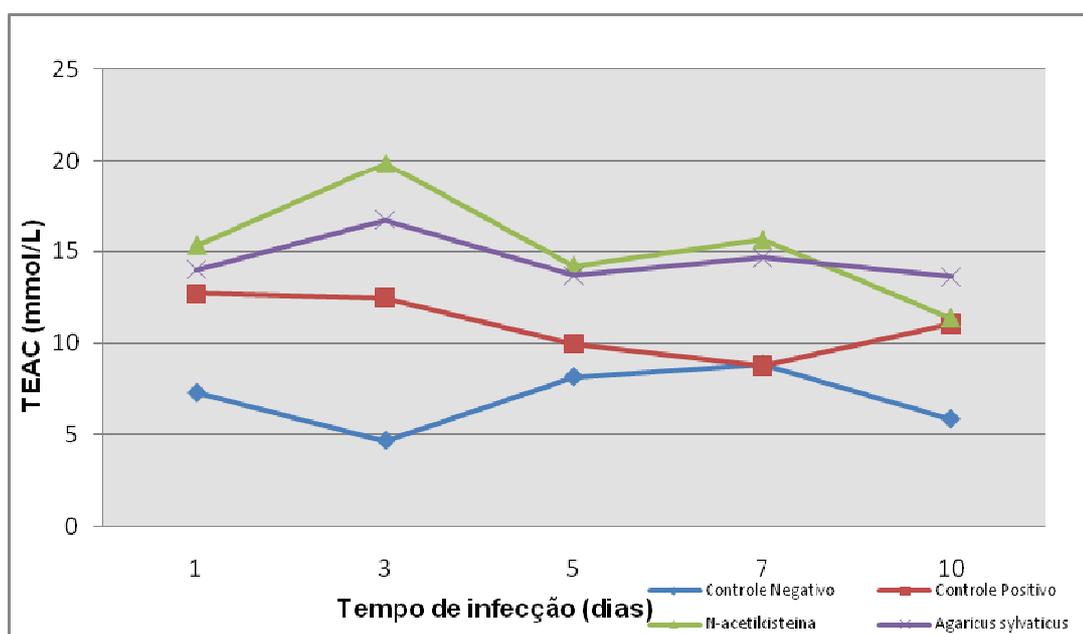


Figura 31 – Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral dos animais dos grupos controles e dos grupos de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

No tecido cerebral ocorreu um aumento da capacidade antioxidante total, pois o grupo controle positivo apresentou níveis significativamente elevados de TEAC no 1º, 3º e 10º dias de infecção ( $p < 0,01$ ). Adicionalmente, os animais infectados e suplementados com antioxidantes apresentaram uma capacidade antioxidante maior do que o grupo controle positivo no 3º, 5º e 7º dias de infecção ( $p < 0,01$ ). Além disso, o grupo NAC apresentou níveis significantes de TEAC no 3º dia de infecção ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos *Agaricus sylvaticus*.

Tabela 11 – Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção.

| Grupo | TEAC (mmol/L)          |                          |                        |                        |                       | p valor * |
|-------|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------|
|       | 1 dia                  | 3 dias                   | 5 dias                 | 7 dias                 | 10 dias               |           |
| CP    | 12,7±2,3 <sup>#@</sup> | 12,4±2,5 <sup>#</sup>    | 9,9±1,2                | 8,7±1,6                | 11,0±1,6 <sup>#</sup> | 0,1231    |
| CN    | 7,3±2,6                | 4,6±1,9                  | 8,1±1,8                | 8,8±0,7                | 5,8±2,1               | 0,1971    |
| NAC   | 15,3±1,2 <sup>#</sup>  | 19,8±1,8 <sup>#§</sup>   | 14,2±3,2 <sup>#§</sup> | 15,6±1,4 <sup>#§</sup> | 11,3±1,7 <sup>#</sup> | 0,00017   |
| AS    | 14,0±0,6 <sup>#</sup>  | 16,7±2,8 <sup>#@\$</sup> | 13,6±1,9 <sup>#§</sup> | 14,6±1,1 <sup>#§</sup> | 13,6±1,8 <sup>#</sup> | 0,5519    |

CP: Controle Positivo. CN: Controle Negativo. NAC: N-acetilcisteína. AS: *Agaricus sylvaticus*. <sup>#</sup>p<0,01xCN; <sup>@</sup>p<0,05NAC; <sup>§</sup>p<0,01xCP. Valores de TEAC expressos como média±desvio padrão. \*t Student 10dias x 1 dia de infecção.

### 5.3.2- Perfil do MDA

A figura 32 mostra o comportamento do Malondialdeído no cérebro dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes em um período de estudo de 10 dias. A tabela 12 mostra os valores de MDA e nível de significância estatística de acordo com os dias de infecção.

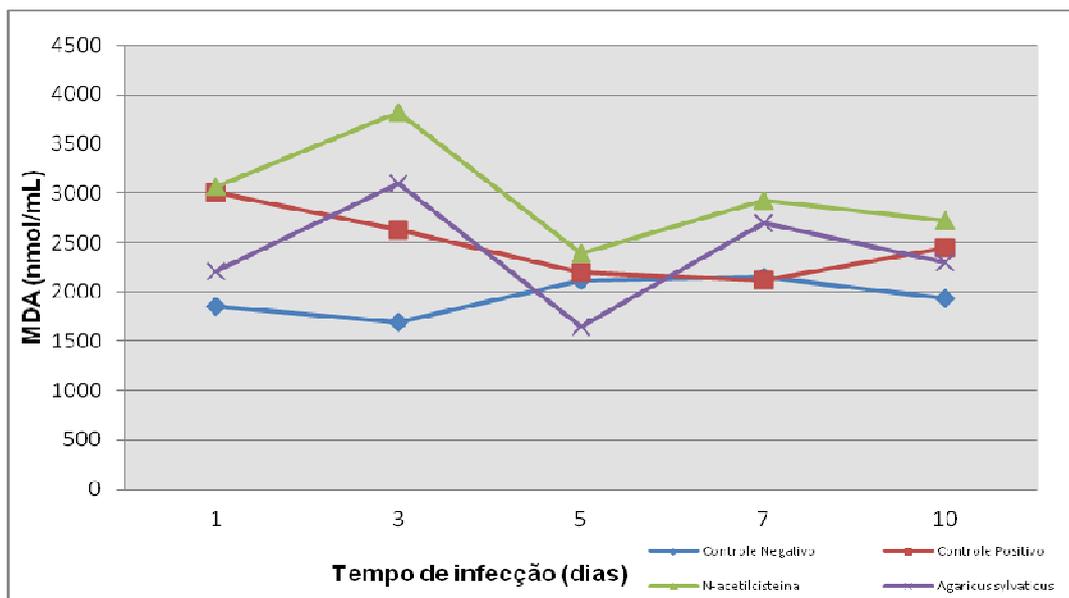


Figura 32- Comportamento do Malondialdeído (MDA) cerebral dos animais dos grupos controles e dos grupos infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

Os valores de MDA no tecido cerebral aumentaram durante a infecção, em relação ao controle negativo, no 1º ( $p < 0,05$ ), 3º ( $p < 0,01$ ) e 10º ( $p < 0,05$ ) dias de infecção ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, nos grupos de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* e N-acetilcisteína, o comportamento foi semelhante durante a infecção, exceto no 5º dia, em que houve uma diminuição nos níveis de MDA no grupo *Agaricus sylvaticus* ( $p < 0,01$ ).

Tabela 12- Malondialdeído (MDA) cerebral e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção.

| Grupo      | MDA (nmol/mL)              |                            |                       |           |           | p valor* |
|------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------|-----------|----------|
|            | 1 dia                      | 3 dias                     | 5 dias                | 7 dias    | 10 dias   |          |
| <b>CP</b>  | 3008±338 <sup>&amp;</sup>  | 2636±349 <sup>#&amp;</sup> | 2193±397              | 2117±1103 | 2450±695  | 0,0886   |
| <b>CN</b>  | 1857±1012                  | 1697±712                   | 2112±420              | 2149±375  | 1930±809  | 0,8611   |
| <b>NAC</b> | 3060±1195 <sup>&amp;</sup> | 3819±773 <sup>#%</sup>     | 2392±452 <sup>@</sup> | 2926±427  | 2721±748  | 0,5442   |
| <b>AS</b>  | 2206±169                   | 3100±437 <sup>#</sup>      | 1648±542              | 2699±742  | 2298±1142 | 0,8092   |

CP: Controle Positivo. CN: Controle Negativo. NAC: N-acetilcisteína. AS: *Agaricus sylvaticus*. <sup>&</sup>P<0,05xCN; <sup>#</sup>p<0,01xCN; <sup>§</sup>p>0,01xNAC; <sup>@</sup>p<0,01xAS; <sup>%</sup>P<0,05xAS. Valores expressos como média±desvio padrão.  
\*t Student 10dias x 1 dia de infecção.

### 5.3.3- Perfil do NO

A figura 33 mostra o comportamento do Óxido Nítrico no cérebro dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes em um período de estudo de 10 dias. A tabela 13 mostra os valores de NO e nível de significância estatística de acordo com os dias de infecção.

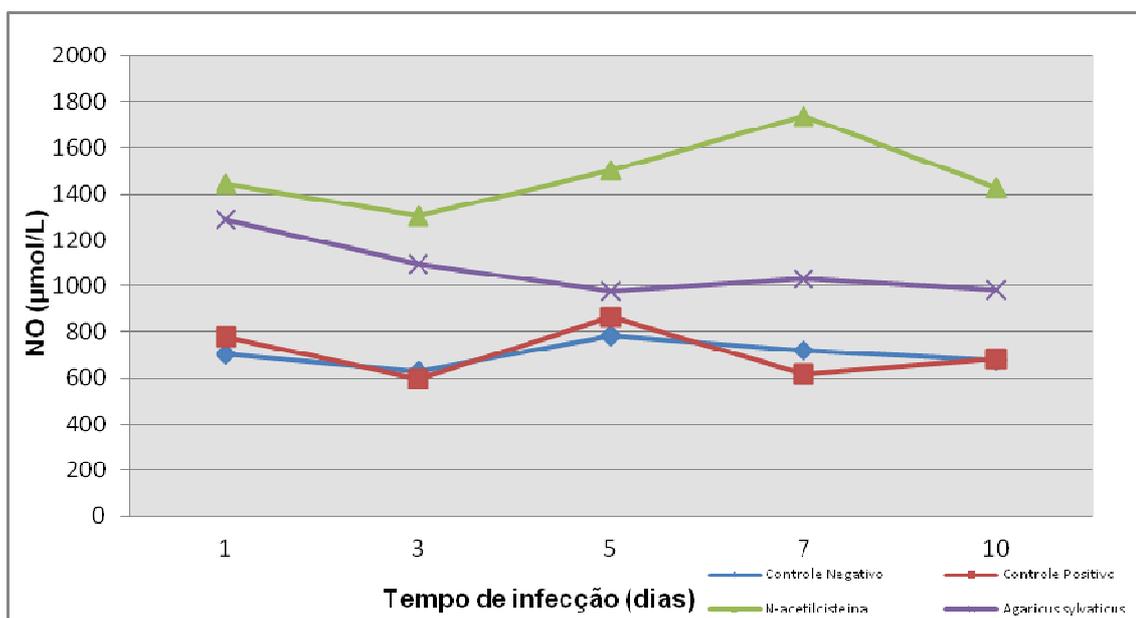


Figura 33- Comportamento do óxido Nítrico (NO) cerebral dos animais dos grupos controles e dos grupos infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

Os grupos controles positivos e negativos apresentaram valores de NO semelhantes durante todo o período de estudo. Os grupos de animais suplementados com N-acetilcisteína apresentaram valores maiores de NO em relação aos controles positivo e negativo durante todo o período de estudo ( $p < 0,01$ ). Foram também superiores aos valores apresentados pelos valores do grupo *Agaricus sylvaticus* no 5º, 7º e 10º dias de infecção ( $p < 0,01$ ). Adicionalmente, o grupo *Agaricus sylvaticus* apresentou níveis significativamente elevados de NO ao 1º ( $p < 0,05$ ) e 3º ( $p < 0,01$ ) dias de infecção, se comparado ao controle positivo.

Tabela 13- Óxido Nítrico (NO) cerebral e significância estatística dos grupos controles de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, de acordo com os dias de infecção, de acordo com os dias de infecção.

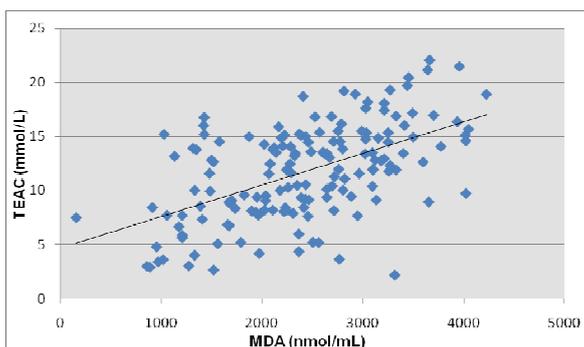
| Grupo | NO (µmol/L)               |                       |                      |                       |                           | p valor* |
|-------|---------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|----------|
|       | 1 dia                     | 3 dias                | 5 dias               | 7 dias                | 10 dias                   |          |
| CP    | 776±294 <sup>#&amp;</sup> | 594±42 <sup>#@</sup>  | 861±465 <sup>#</sup> | 619±151 <sup>#</sup>  | 684±251 <sup>#</sup>      | 0,5279   |
| CN    | 706±269 <sup>#@</sup>     | 628±175 <sup>#@</sup> | 782±347 <sup>#</sup> | 719±234 <sup>#</sup>  | 674±164 <sup>#&amp;</sup> | 0,7685   |
| NAC   | 1443±479                  | 1303±287              | 1502±248             | 1741±494              | 1429±96                   | 0,9520   |
| AS    | 1289±1534                 | 1095±55               | 977±67 <sup>#</sup>  | 1032±176 <sup>#</sup> | 982±129 <sup>#</sup>      | 0,0043   |

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; NAC: N-acetilcisteína; AS: *Agaricus sylvaticus*.  
<sup>#</sup>P<0,01xNAC; <sup>&</sup>p<0,05xAS; <sup>@</sup>p<0,01xAS. Valores expressos como média±desvio padrão. \*t Student 10dias x 1 dia de infecção.

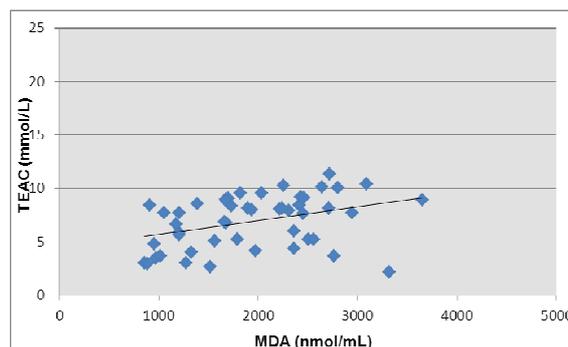
### 5.3.4- Estudo de Correlação em Amostras Cerebrais

#### 5.3.4.1- Correlação entre MDA e TEAC

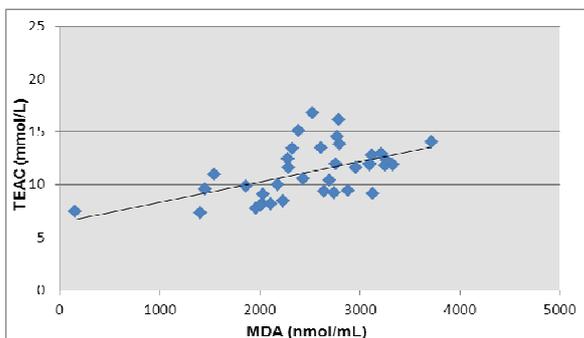
A figura 34 mostra a correlação entre MDA e TEAC nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d, e). A tabela 14 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



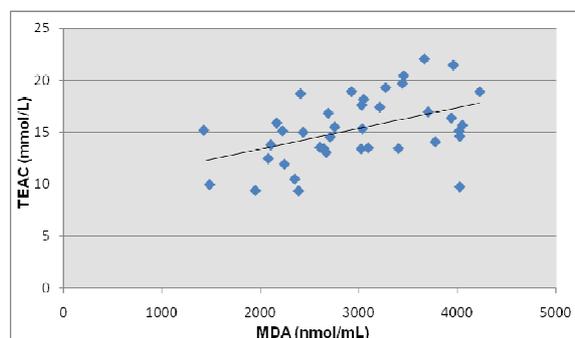
a) Todos os grupos ( $r=0,5450$  e  $p<0,0001$ )



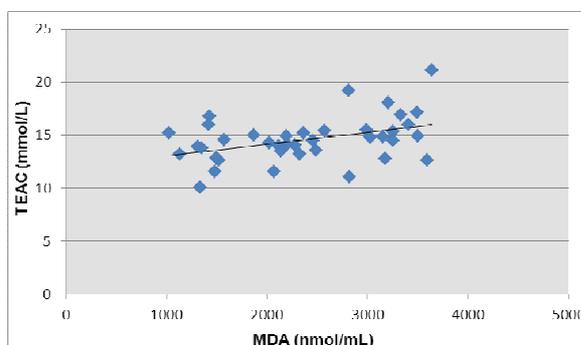
c) Controle negativo ( $r=0,3712$  e  $p=0,0086$ )



b) Controle positivo ( $r=0,5300$  e  $p=0,0007$ )



d) N-acetilcisteína ( $r=0,5328$  e  $p=0,0004$ )



e) *Agaricus sylvaticus* ( $r=0,4205$  e  $p=0,0076$ )

Figura 34: Correlação entre Malondialdeído (MDA) e Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

A análise mostrou que há uma correlação positiva moderada e altamente significativa entre MDA e TEAC cerebral, considerando todos os grupos (a;  $r=0,5450$  e  $p<0,0001$ ), no controle positivo (b;  $r=0,5300$  e  $p=0,0007$ ), no grupo controle negativo ( $r=0,3712$  e  $p=0,0086$ ), grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína (d;  $r=0,5328$  e  $p=0,0004$ ) e grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* (e;  $r=0,4205$  e  $p=0,0076$ ).

Tabela 14 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre MDA e TEAC em amostras cerebrais de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

| Grupo                      | N   | r      | p valor  |
|----------------------------|-----|--------|----------|
| Todos os Grupos            | 158 | 0,5450 | < 0,0001 |
| Controle Positivo          | 37  | 0,5300 | 0,0007   |
| Controle Negativo          | 49  | 0,3712 | 0,0086   |
| N-acetilcisteína           | 40  | 0,5328 | 0,0004   |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 39  | 0,4205 | 0,0076   |

N= número de amostras; r= Coeficiente de correlação de Pearson.

A figura 35 mostra o comportamento de MDA e TEAC cerebral para os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.

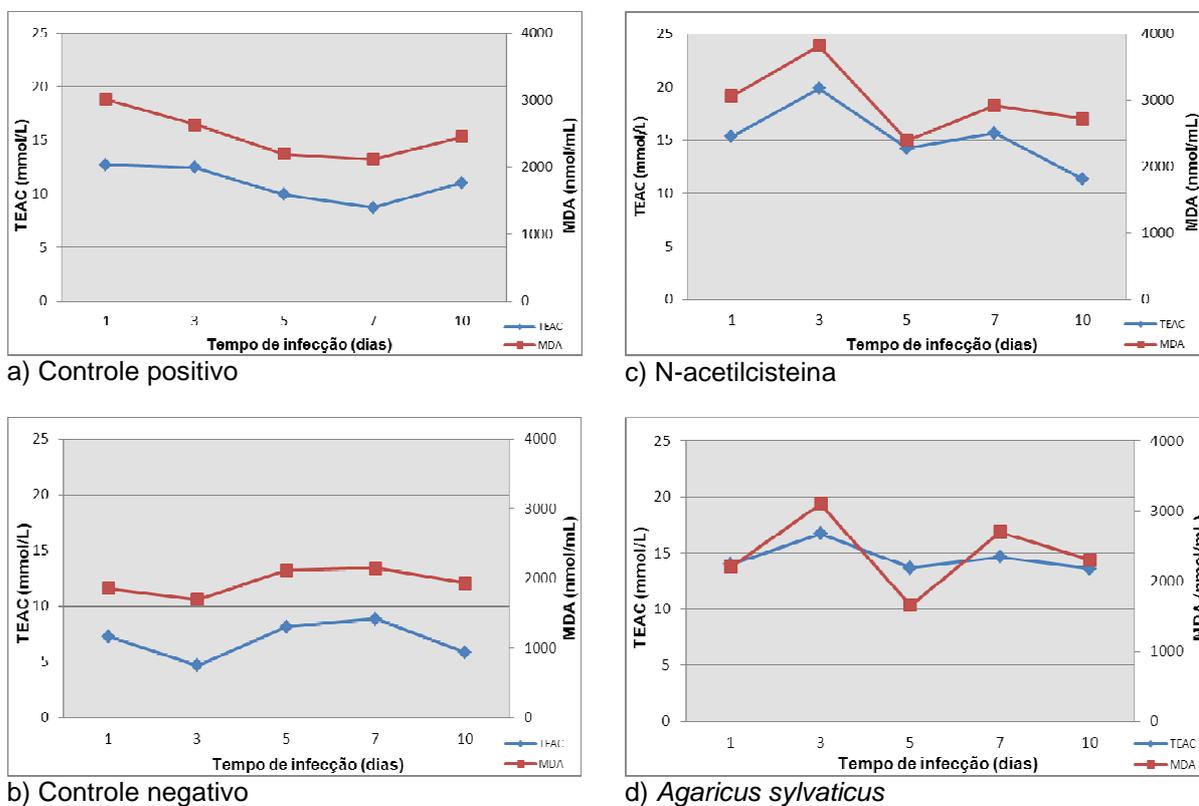
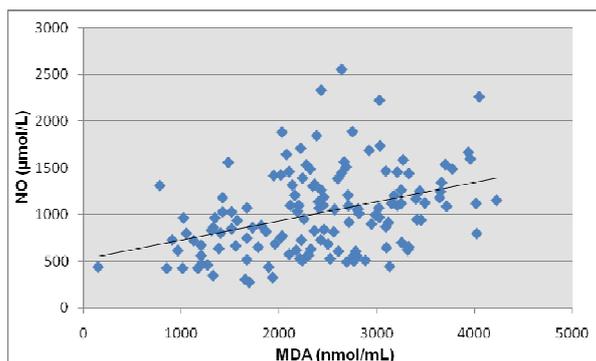


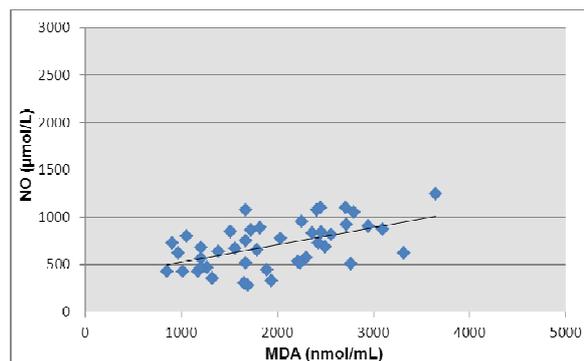
Figura 35- Comportamento de Malondialdeído (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

### 5.3.4.2- Correlação entre MDA e NO

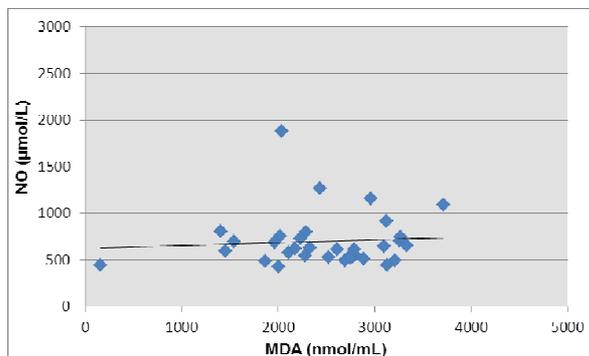
A figura 36 mostra a correlação entre MDA e NO nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d, e). A tabela 15 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



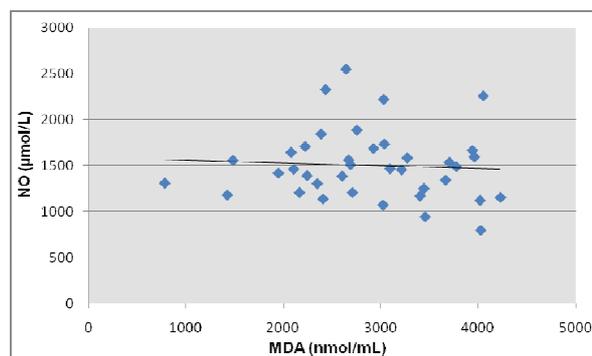
a) Todos os grupos ( $r=0,3780$  e  $p<0,0001$ )



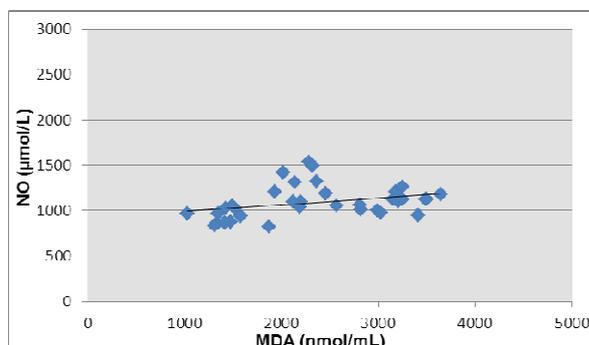
c) Controle negativo ( $r=0,5281$  e  $p=0,0002$ ).



b) Controle positivo ( $r=0,0763$  e  $p=0,6681$ )



d) N-acetilcisteína ( $r=-0,0654$  e  $p=0,6965$ ).



e) *Agaricus sylvaticus* ( $r=0,3233$  e  $p=0,0581$ ).

Figura 36: Correlação entre Malondialdeído (MDA) e Óxido Nítrico (NO) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

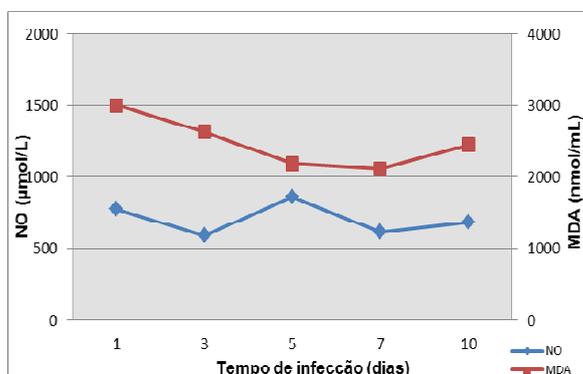
Existe correlação positiva moderada e altamente significativa ( $r=0,3780$  e  $p<0,0001$ ) entre MDA e NO cerebral, considerando todos os grupos (a) e no grupo controle negativo (c;  $r=0,5281$  e  $p=0,0002$ ). No grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* (e) houve uma tendência de significância estatística ( $r=0,3233$  e  $p=0,0581$ ).

Tabela 15 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre MDA e NO em amostras cerebrais de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

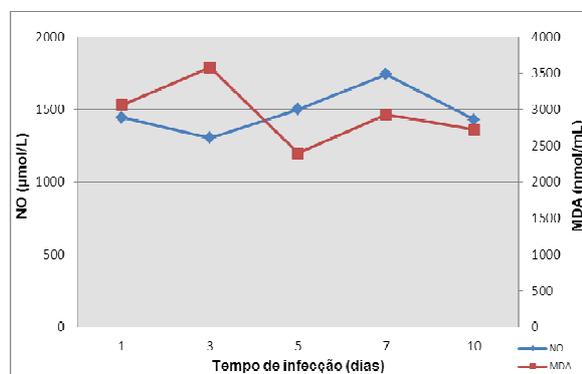
| Grupo                      | N   | r       | p valor  |
|----------------------------|-----|---------|----------|
| Todos os Grupos            | 140 | 0,3780  | < 0,0001 |
| Controle Positivo          | 34  | 0,0763  | 0,6681   |
| Controle Negativo          | 44  | 0,5281  | 0,0002   |
| N-acetilcisteína           | 38  | -0,0654 | 0,6965   |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 35  | 0,3233  | 0,0581   |

N= número de amostras; r= Coeficiente de correlação de Pearson.

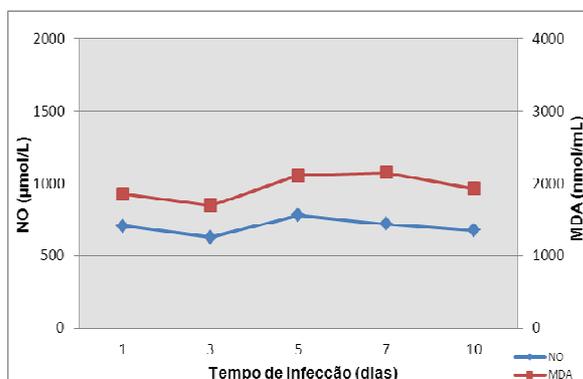
A figura 37 mostra o comportamento de MDA e NO cerebral para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.



a) Controle positivo



c) N-acetilcisteína



b) Controle negativo

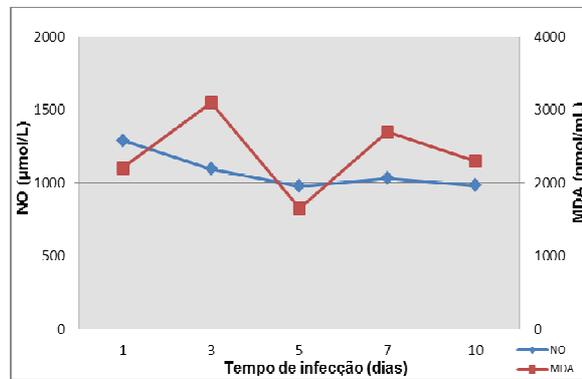
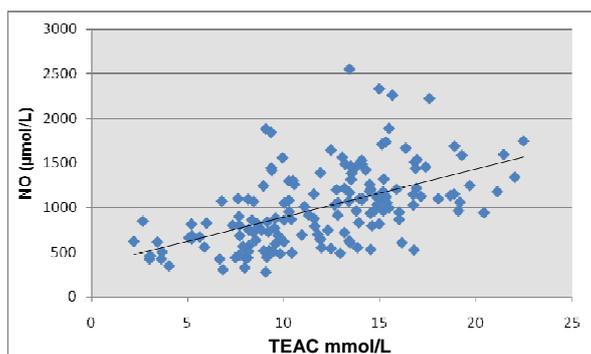
d) *Agaricus sylvaticus*

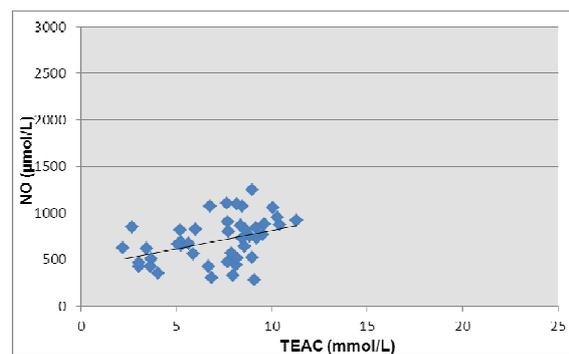
Figura 37- Comportamento de Malondialdeído (MDA) e Óxido Nítrico (NO) cerebral nos animais para cada grupo, em função do tempo de infecção.

### 5.3.4.3- Correlação entre TEAC e NO

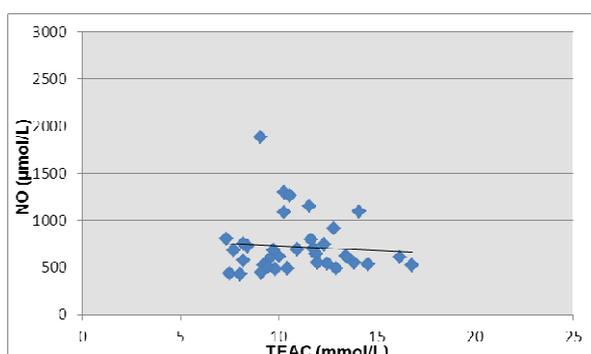
A figura 38 mostra a correlação entre TEAC e NO nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d, e). A tabela 16 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



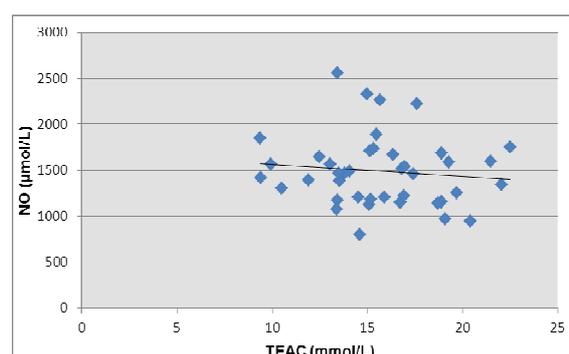
a) Todos os grupos ( $r=0,5391$  e  $p<0,0001$ )



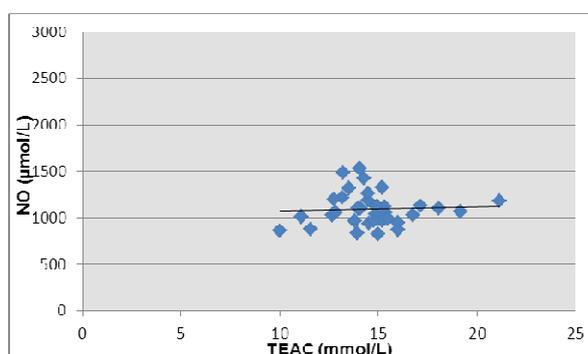
c) Controle negativo ( $r=0,3863$  e  $p=0,0087$ ).



b) Controle positivo ( $r=-0,0719$  e  $p=0,6723$ ).



d) N-acetilcisteína ( $r=-0,1128$  e  $p=0,4827$ )



e) *Agaricus sylvaticus* ( $r=0,0501$  e  $p=0,7752$ ).

Figura 38: Correlação entre Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e Óxido Nítrico (NO) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteína (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

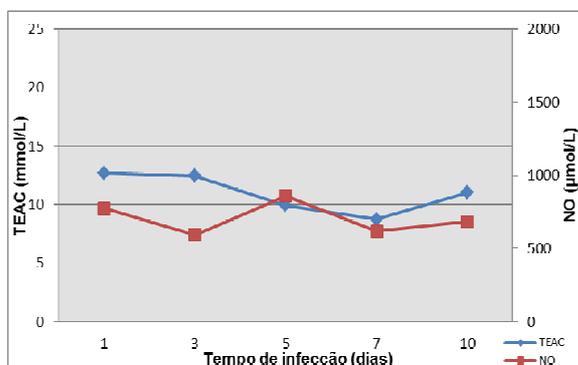
Há uma correlação positiva moderada e altamente significativa entre TEAC e NO cerebral, considerando todos os grupos (a;  $r=0,5391$  e  $p<0,0001$ ) e no grupo controle negativo (c;  $r=0,3863$  e  $p=0,0087$ ), o que não foi encontrado no grupo controle positivo (b). Não houve significância estatística entre TEAC e NO nos grupos suplementados N-acetilcisteína (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

Tabela 16 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação entre TEAC e NO em amostras cerebrais de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

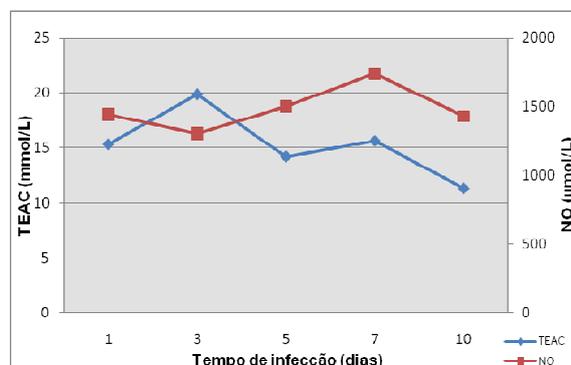
| <b>Grupo</b>               | <b>N</b> | <b>r</b> | <b>p valor</b> |
|----------------------------|----------|----------|----------------|
| Todos os Grupos            | 161      | 0,5391   | <0,0001        |
| Controle Positivo          | 37       | -0,0719  | 0,6723         |
| Controle Negativo          | 45       | 0,3863   | 0,0087         |
| N-acetilcisteína           | 41       | -0,1128  | 0,4827         |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 35       | 0,0501   | 0,7752         |

N= número de amostras, r= Coeficiente de correlação de Pearson.

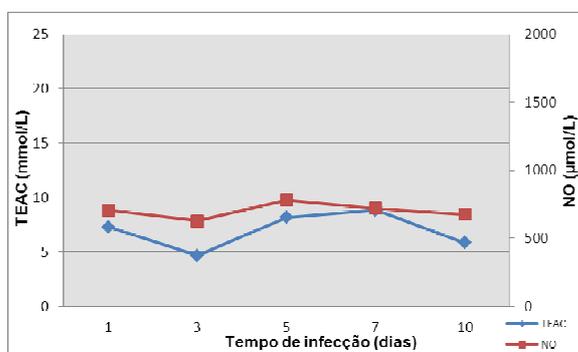
A figura 39 mostra o comportamento de TEAC e NO cerebral para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.



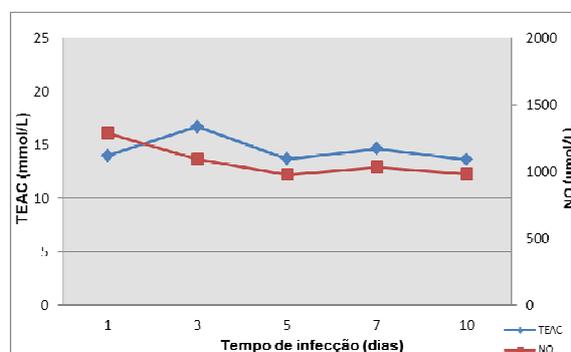
a) Controle positivo



c) N-acetilcisteína



b) Controle negativo

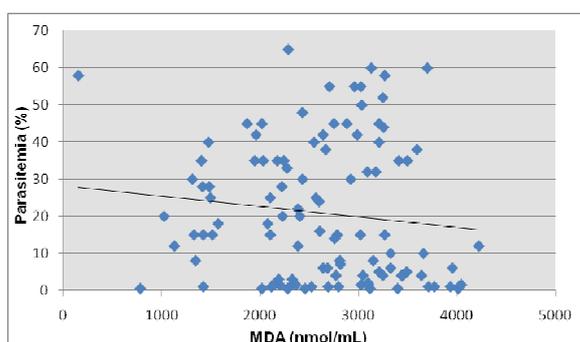


d) *Agaricus sylvaticus*

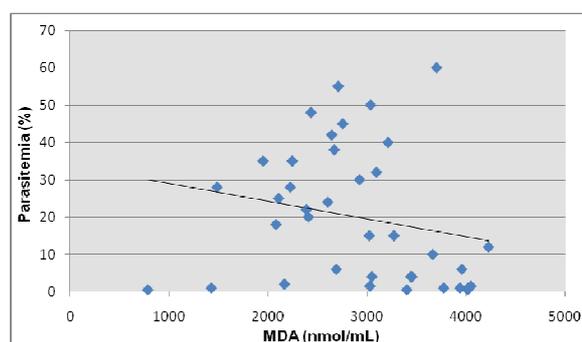
Figura 39- Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e do Óxido Nítrico (NO) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

### 5.3.4.4- Correlação entre Parasitemia e MDA

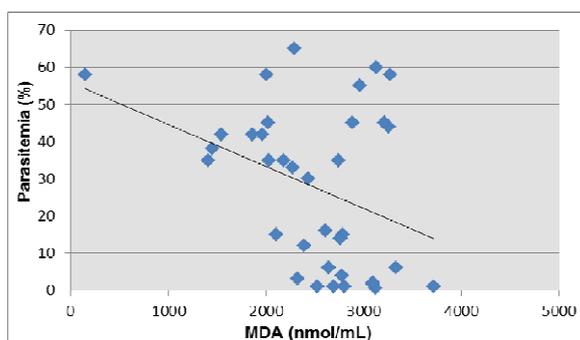
A figura 40 mostra a correlação entre Parasitemia e MDA nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d). A tabela 17 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



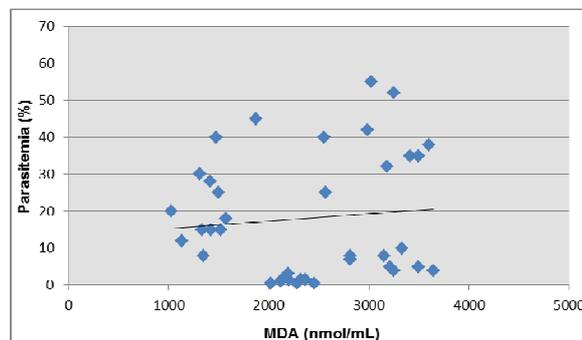
a) Todos os grupos ( $r=-0,1199$  e  $p=0,2166$ ).



c) N-acetilcisteína ( $r=-0,2090$  e  $p=0,1955$ ).



b) Controle positivo ( $r=-0,3647$  e  $p=0,0287$ ).



d) *Agaricus sylvaticus* ( $r=0,0991$  e  $p=0,5539$ ).

Figura 40: Correlação entre Parasitemia e Malondialdeído (MDA) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se todos os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

Há uma correlação negativa moderada e significativa entre MDA cerebral e parasitemia apenas no grupo controle positivo (b;  $r=-0,3647$  e  $p=0,0287$ ).

Tabela 17 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e significância da correlação entre Parasitemia e MDA das amostras cerebrais de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

| Grupo                      | N   | $r$     | $p$ valor |
|----------------------------|-----|---------|-----------|
| Todos os Grupos            | 108 | -0,1199 | 0,2166    |
| Controle Positivo          | 36  | -0,3647 | 0,0287    |
| N-acetilcisteína           | 40  | -0,2090 | 0,1955    |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 38  | 0,0991  | 0,5539    |

N= número de amostras;  $r$ : Coeficiente de correlação.

A figura 41 mostra o comportamento da parasitemia e do MDA cerebral para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.

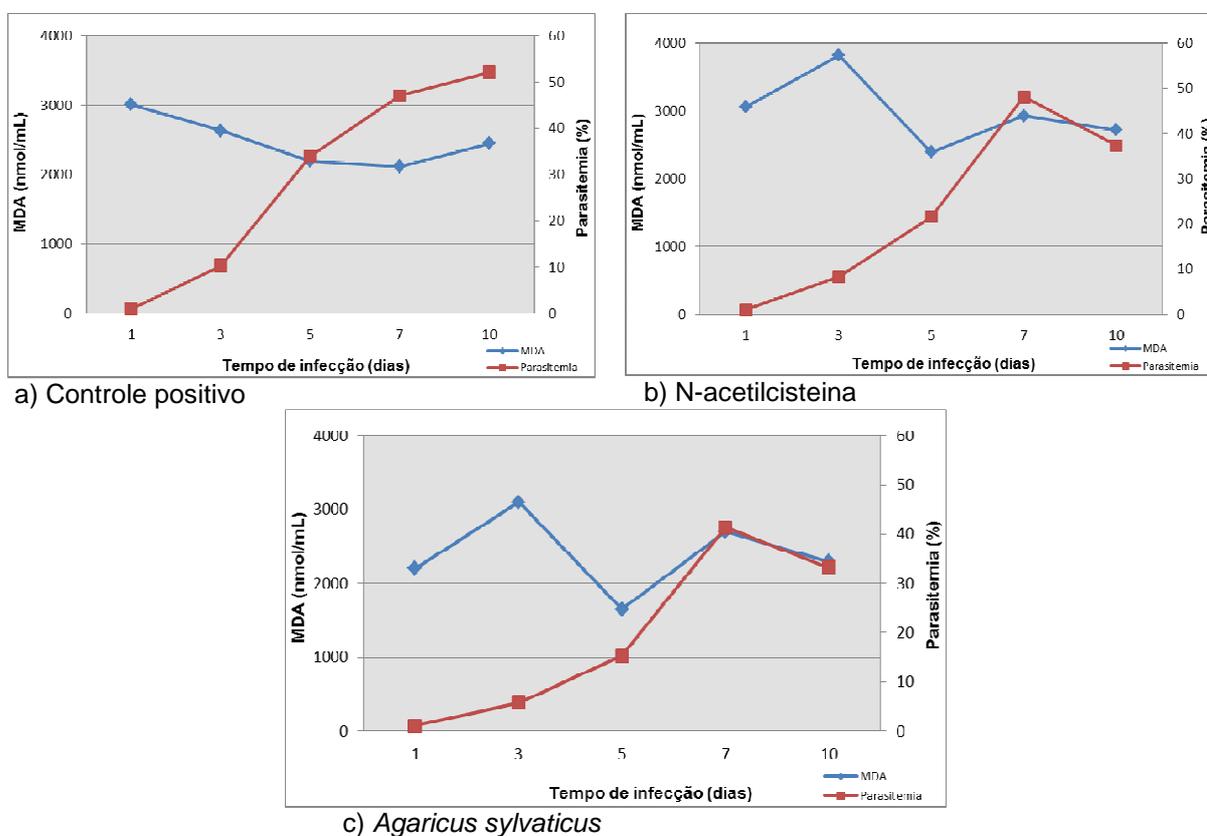
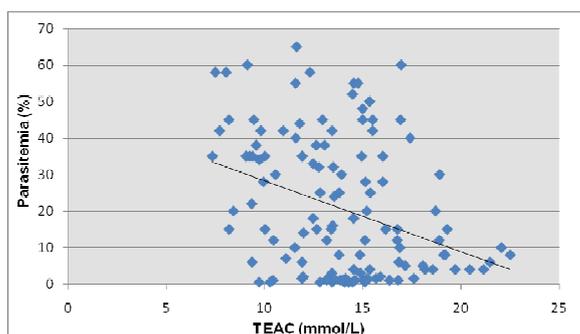


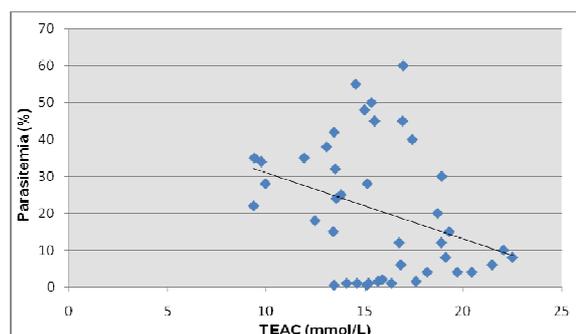
Figura 41- Comporamento da Parasitemia e do Malondialdeido (MDA) cerebral nos animais para cada grupo, em função do tempo de infecção.

### 5.3.4.5- Correlação entre Parasitemia e TEAC

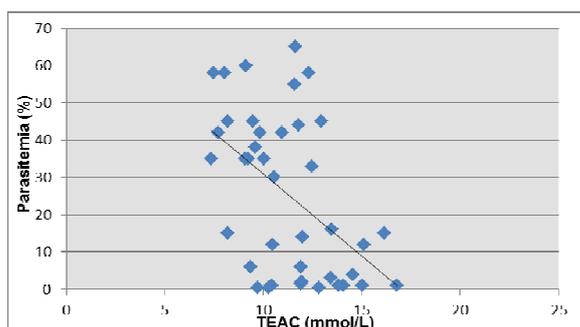
A figura 42 mostra a correlação entre Parasitemia e TEAC nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d). A tabela 18 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



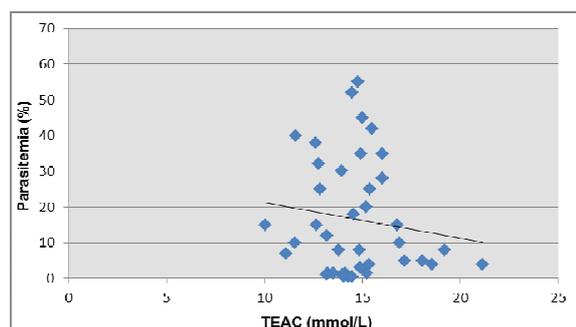
a) Todos os grupos ( $r=-0,3454$  e  $p<0,0001$ )



c) N-acetilcisteína ( $r=-0,3327$  e  $p=0,0313$ ).



b) Controle positivo ( $r=-0,4956$  e  $p=0,0011$ ).



d) *Agaricus sylvaticus* ( $r=-0,1346$  e  $p=0,4076$ ).

Figura 42: Correlação entre Parasitemia e Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

Houve correlação negativa moderada e altamente significativa, considerando todos os grupos (a;  $r=-0,3454$  e  $p<0,0001$ ) e no grupo controle positivo (b;  $r=-0,4956$  e  $p=0,0011$ ). No grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína (c) há uma correlação negativa moderada e significativa ( $r=-0,3327$  e  $p=0,0313$ ).

Tabela 18 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e significância da correlação entre Parasitemia e TEAC das amostras cerebrais de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

| Grupo                      | N   | $r$     | $p$ valor |
|----------------------------|-----|---------|-----------|
| Todos os Grupos            | 123 | -0,3454 | < 0,0001  |
| Controle Positivo          | 40  | -0,4956 | 0,0011    |
| N-acetilcisteína           | 42  | -0,3327 | 0,0313    |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 40  | -0,1346 | 0,4076    |

N= número de amostras;  $r$ : Coeficiente de correlação de Pearson.

A figura 43 mostra o comportamento da parasitemia e do TEAC cerebral para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.

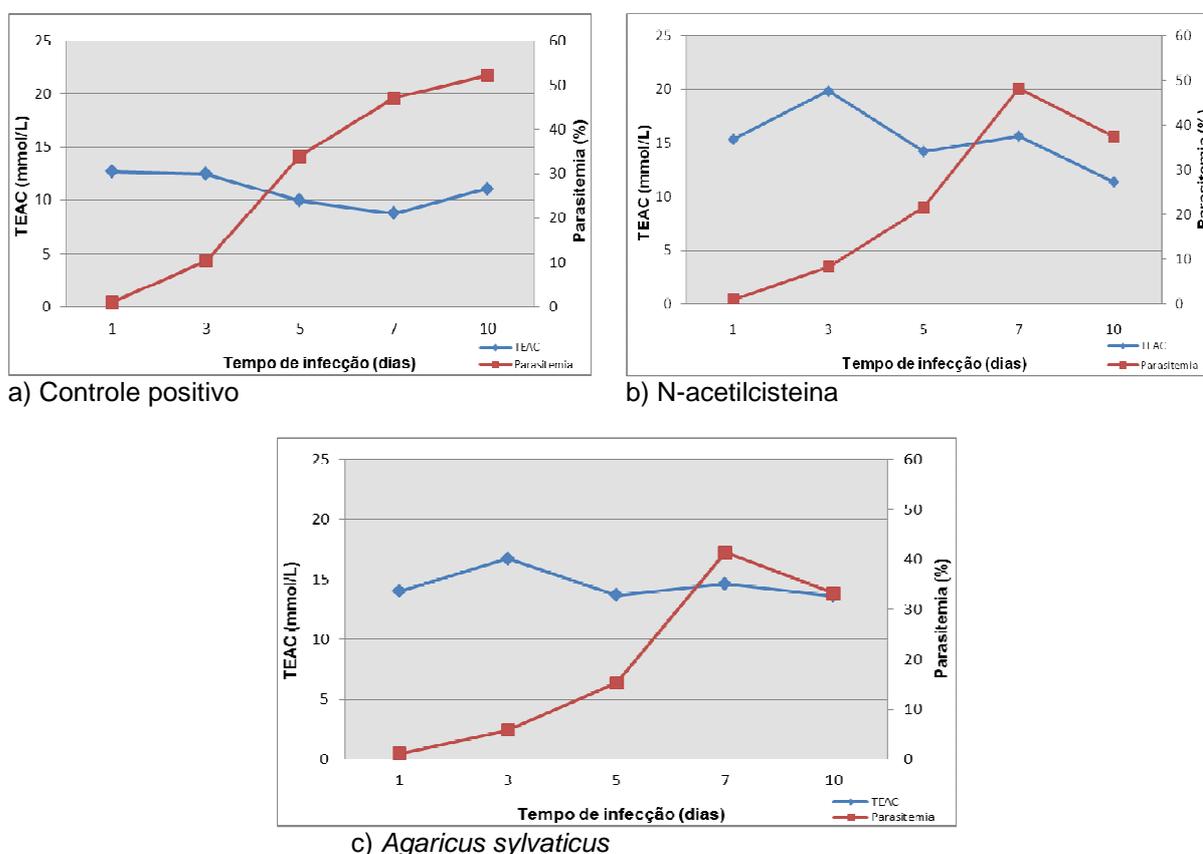
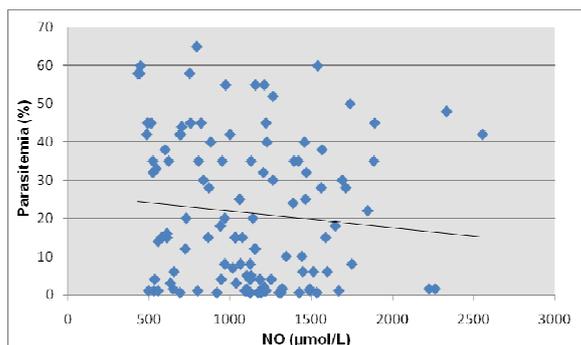


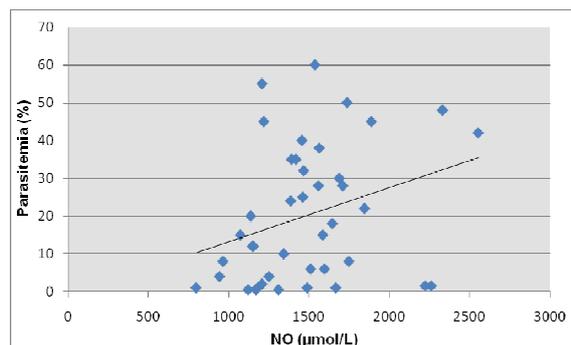
Figura 43- Comportamento da Parasitemia e da Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

### 5.3.4.6- Correlação entre Parasitemia e NO

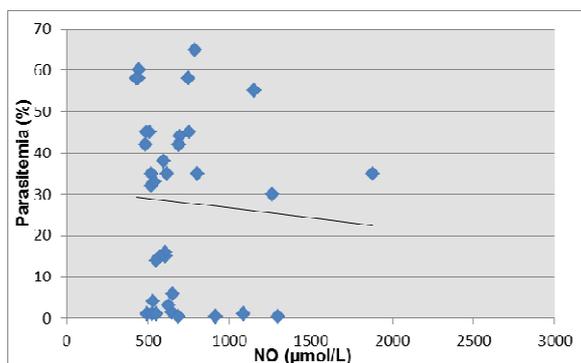
A figura 44 mostra a correlação entre Parasitemia e NO nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d). A tabela 19 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



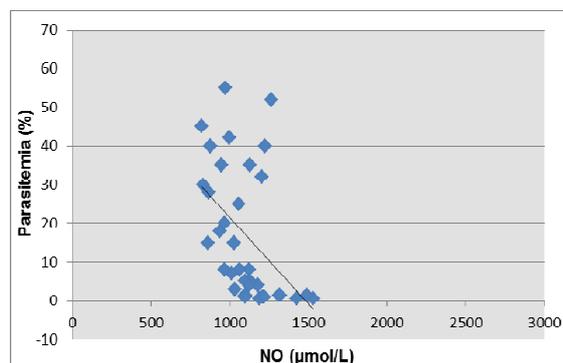
a) Todos os grupos ( $r=-0,1023$  e  $p=0,2721$ )



c) N-acetilcisteina ( $r=0,3056$  e  $p=0,0519$ ).



b) Controle positivo ( $r=-0,0649$  e  $p=0,7068$ )



d) *Agaricus sylvaticus* ( $r=-0,4578$  e  $p=0,0044$ )

Figura 44: Correlação entre Parasitemia e Óxido Nítrico (NO) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteina (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

Apenas no grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* houve uma correlação negativa moderada e altamente significativa ( $r=-0,4578$  e  $p=0,0044$ ) entre Parasitemia e NO.

Tabela 19 – Valores do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e significância da correlação entre Parasitemia e NO das amostras cerebrais de camundongos infectados pelo *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

| Grupo                      | N   | $r$     | $p$ valor |
|----------------------------|-----|---------|-----------|
| Todos os Grupos            | 117 | -0,1023 | 0,2721    |
| Controle Positivo          | 38  | -0,0649 | 0,7068    |
| N-acetilcisteína           | 41  | 0,3056  | 0,0519    |
| <i>Agaricus sylvaticus</i> | 38  | -0,4578 | 0,0044    |

N= número de amostras.  $r$ : Coeficiente de correlação de Pearson.

A figura 45 mostra o comportamento da Parasitemia e do NO cerebral para todos os grupos individualmente, de acordo com o tempo de infecção.

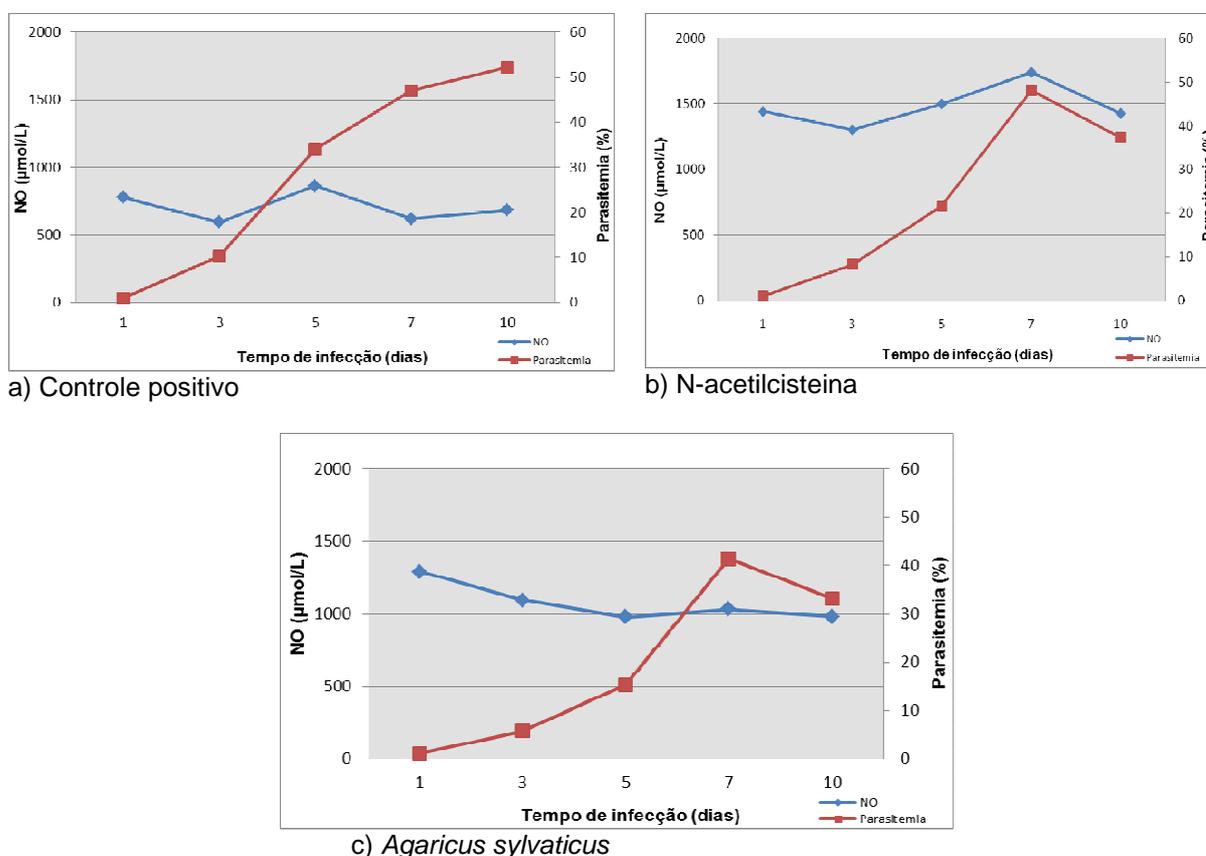


Figura 45- Comportamento da Parasitemia e do Óxido Nítrico (NO) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

### 5.3.5 – Correlação entre Pulmão e Cérebro

#### 5.3.5.2- Correlação entre TEAC Pulmonar e Cerebral

As figuras 46, 47, 48 e 49 mostram o comportamento do TEAC nos tecidos pulmonar e cerebral no grupo de animais controles e de animais infectados com *P. berghei* e suplementados com antioxidantes em um período de estudo de 10 dias. As tabelas 20, 21, 22 e 23 mostram os valores de TEAC para pulmão e cérebro e a significância estatística dessa relação.

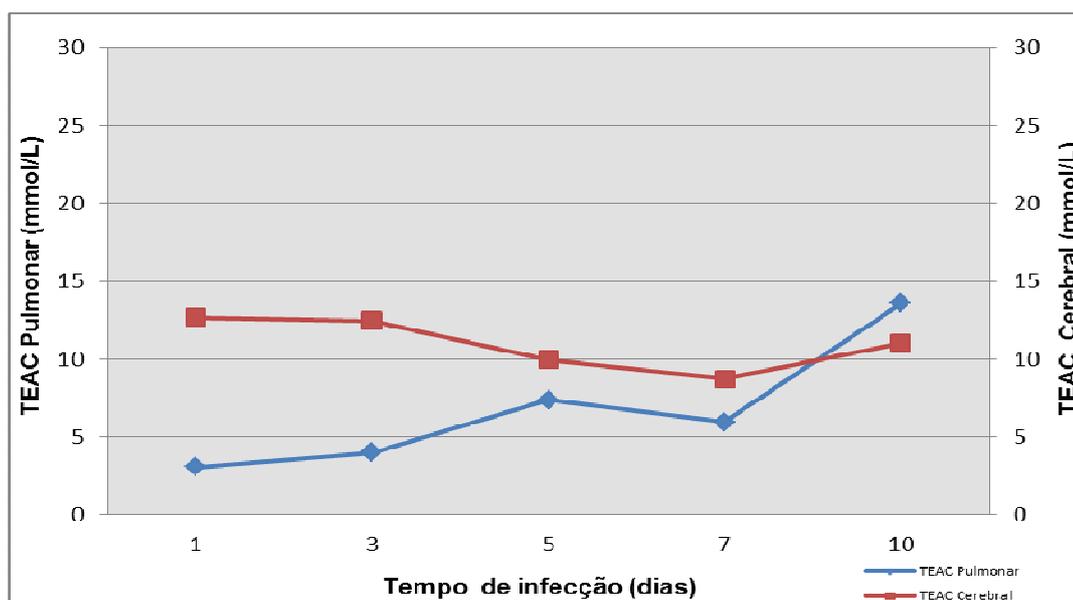


Figura 46: Comportamento da Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) entre e Cérebro no grupo controle positivo.

Tabela 20: Valores de TEAC e significância estatística no grupo controle positivo para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | TEAC (mmol/L) |          | p valor*                |
|------------------|---------------|----------|-------------------------|
|                  | PULMÃO        | CÉREBRO  |                         |
| 1                | 3,3±0,9       | 12,7±2,3 | 3,334x10 <sup>-10</sup> |
| 3                | 3,8±0,8       | 12,5±2,6 | 2,586x10 <sup>-8</sup>  |
| 5                | 7,9±2,2       | 9,9±1,23 | 0,0382                  |
| 7                | 5,9±0,5       | 8,7±1,6  | 0,0037                  |
| 10               | 13,8±4,63     | 11,0±1,6 | 0,1562                  |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

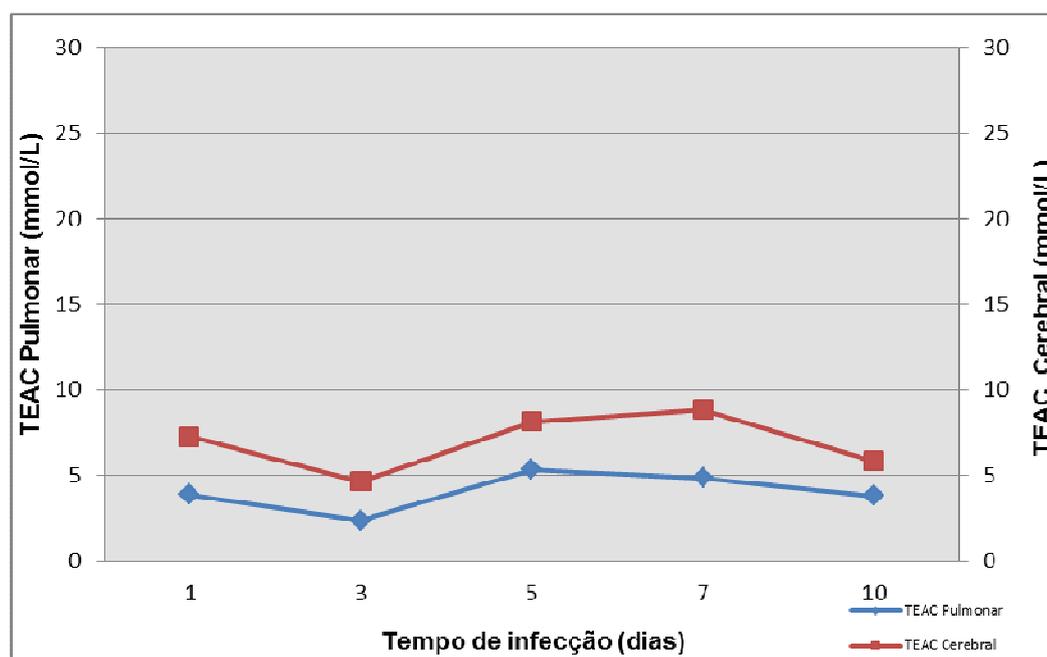


Figura 47: Comportamento da Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle negativo.

Tabela 21: Valores de TEAC e significância estatística no grupo controle negativo para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | TEAC (mmol/L) |         | p valor*                |
|------------------|---------------|---------|-------------------------|
|                  | PULMÃO        | CÉREBRO |                         |
| 1                | 3,9±1,2       | 7,3±2,6 | 0,0016                  |
| 3                | 2,5±0,9       | 4,7±1,9 | 0,0049                  |
| 5                | 5,3±1,5       | 8,1±1,8 | 0,0023                  |
| 7                | 4,8±0,6       | 8,8±0,7 | 9,750x10 <sup>-11</sup> |
| 10               | 4,0±1,5       | 5,8±2,1 | 0,0448                  |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

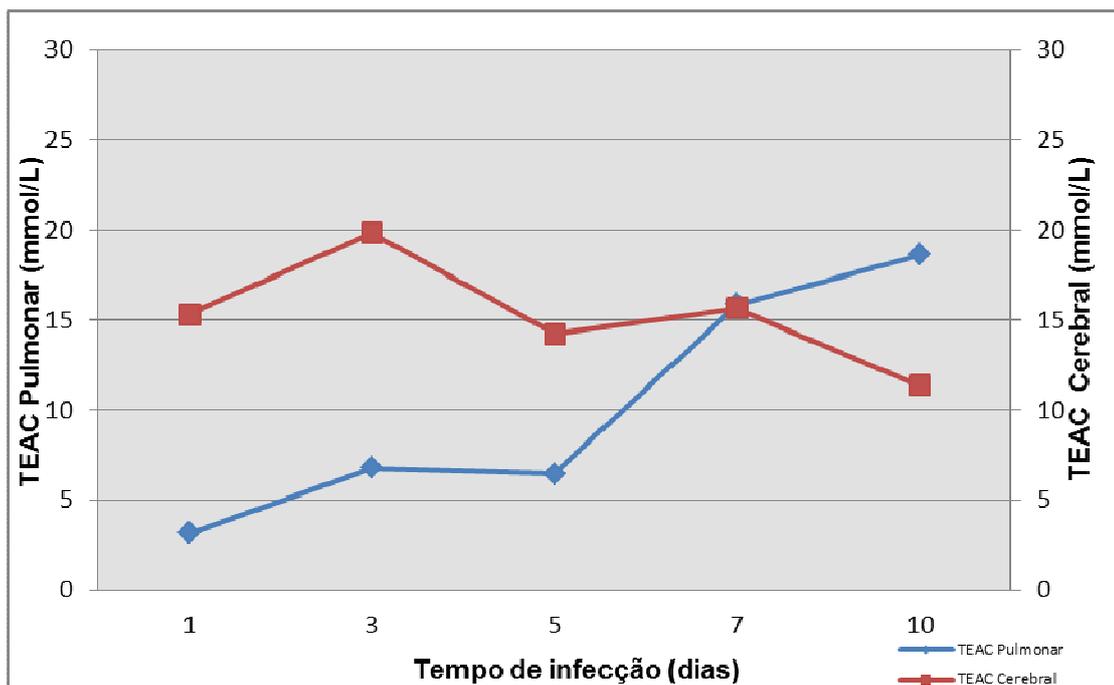


Figura 48: Comportamento da Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com N-acetilcisteína.

Tabela 22: Valores de TEAC e significância estatística no grupo suplementado com N-acetilcisteína para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | TEAC (mmol/L) |          | p valor*                |
|------------------|---------------|----------|-------------------------|
|                  | PULMÃO        | CÉREBRO  |                         |
| 1                | 3,5±1,1       | 15,3±1,2 | 8,012x10 <sup>-14</sup> |
| 3                | 7,3±0,8       | 19,8±1,8 | 2,897x10 <sup>-11</sup> |
| 5                | 7,1±1,5       | 14,2±3,3 | 4,669x10 <sup>-6</sup>  |
| 7                | 15,8±5,0      | 15,6±1,4 | 0,9077                  |
| 10               | 18,6±3,5      | 11,3±1,7 | 0,0011                  |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

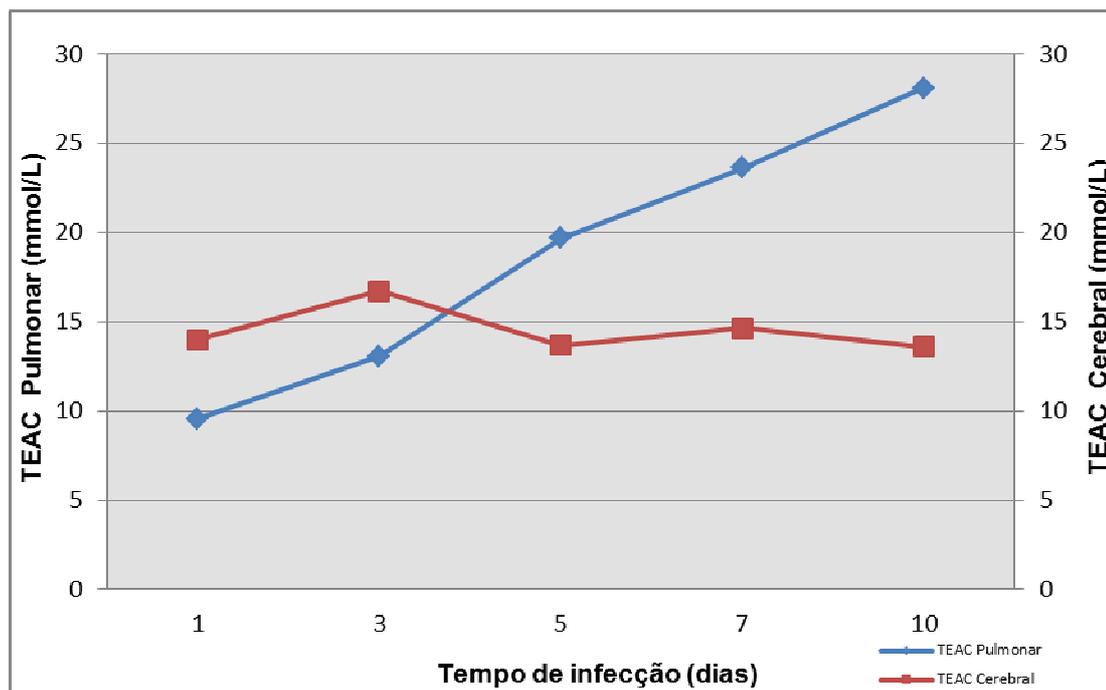


Figura 49: Comportamento da Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com *Agaricus sylvaticus*.

Tabela 23: Valores de TEAC e significância estatística no grupo suplementado com *Agaricus sylvaticus* para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | TEAC (mmol/L) |          | p valor*               |
|------------------|---------------|----------|------------------------|
|                  | PULMÃO        | CÉREBRO  |                        |
| 1                | 10,1±2,3      | 14,0±0,6 | 0,0001                 |
| 3                | 13,8±1,4      | 16,7±2,8 | 0,0135                 |
| 5                | 19,7±4,9      | 13,7±2,0 | 0,002                  |
| 7                | 23,6±2,3      | 14,6±1,1 | 6,750x10 <sup>-7</sup> |
| 10               | 28,1±5,8      | 13,6±1,8 | 0,0007                 |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

### 5.3.5.1- Correlação entre MDA Pulmonar e Cerebral

As figuras 50, 51, 52 e 53 mostram o comportamento do MDA nos tecidos pulmonar e cerebral no grupo de animais controles e de animais infectados com *P. berghei* e suplementados com antioxidantes em um período de estudo de 10 dias. As tabelas 24, 25, 26 e 27 mostram os valores de MDA para pulmão e cérebro e a significância estatística dessa relação.

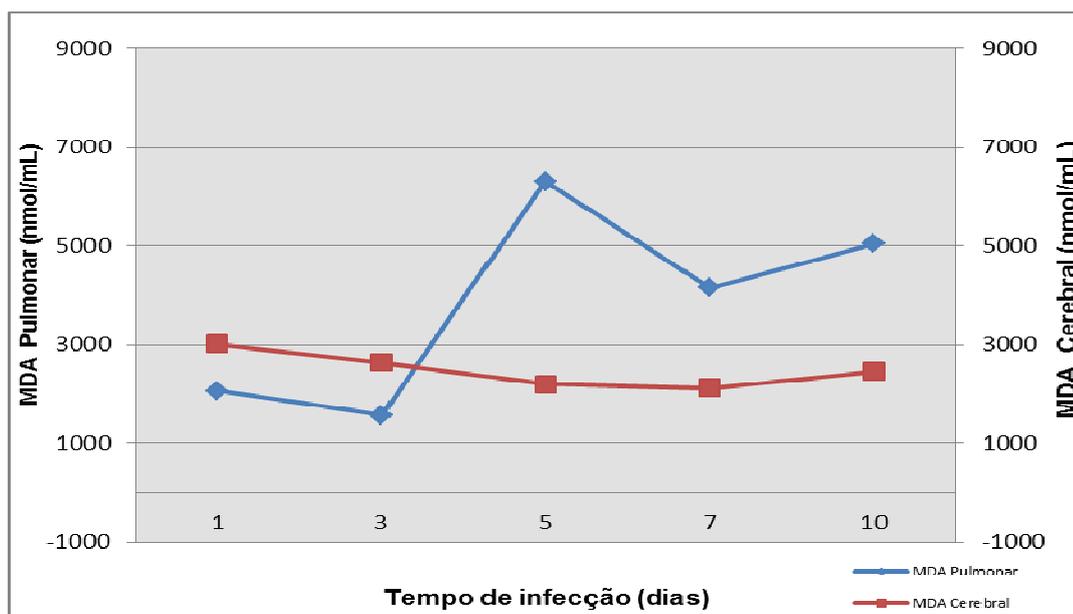


Figura 50: Comportamento do Malondialdeído (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle positivo.

Tabela 24: Valores de MDA e significância estatística no grupo controle positivo para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | MDA (nmol/mL) |           | p valor*               |
|------------------|---------------|-----------|------------------------|
|                  | PULMÃO        | CÉREBRO   |                        |
| 1                | 2063±1240     | 3008±388  | 0,0722                 |
| 3                | 1569±556      | 2636±349  | 0,0001                 |
| 5                | 6307±1913     | 2193±397  | 7,072x10 <sup>-5</sup> |
| 7                | 4153±2679     | 2117±1103 | 0,0594                 |
| 10               | 5051±921      | 2450±695  | 0,0001                 |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

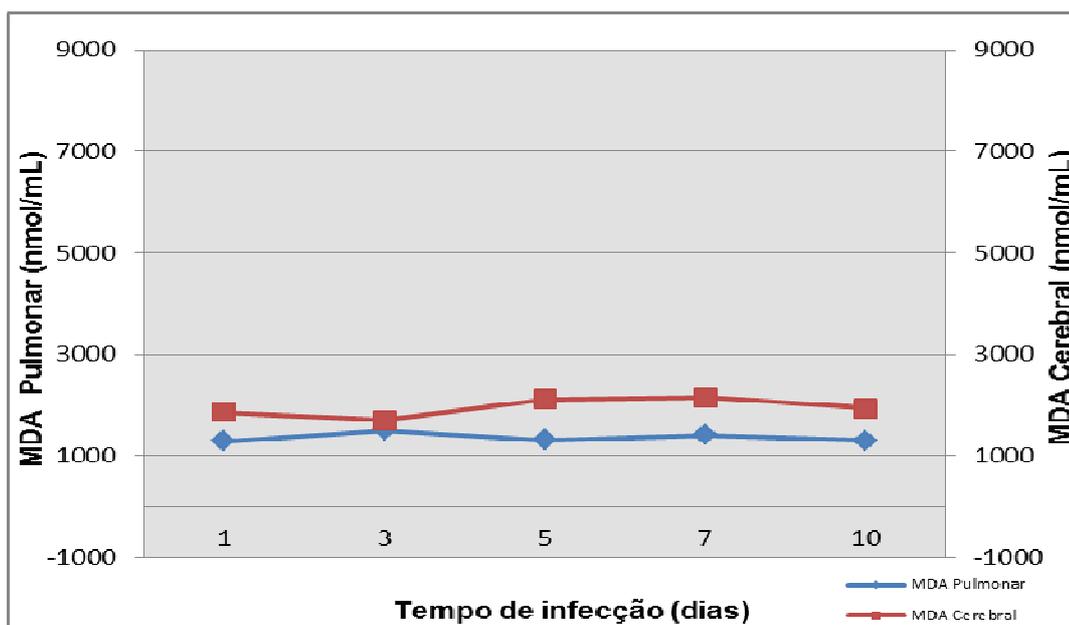


Figura 51: Comportamento do Malondialdeido (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle negativo.

Tabela 25: Valores de MDA e significância estatística no grupo controle negativo para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | MDA (nmol/mL) |           | p valor* |
|------------------|---------------|-----------|----------|
|                  | PULMÃO        | CÉREBRO   |          |
| 1                | 1282±132      | 1857±1012 | 0,1327   |
| 3                | 1498±567      | 1697±712  | 0,4970   |
| 5                | 1314±401      | 2112±420  | 0,0004   |
| 7                | 1403±421      | 2149±375  | 0,0008   |
| 10               | 1293±231      | 1930±809  | 0,0361   |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

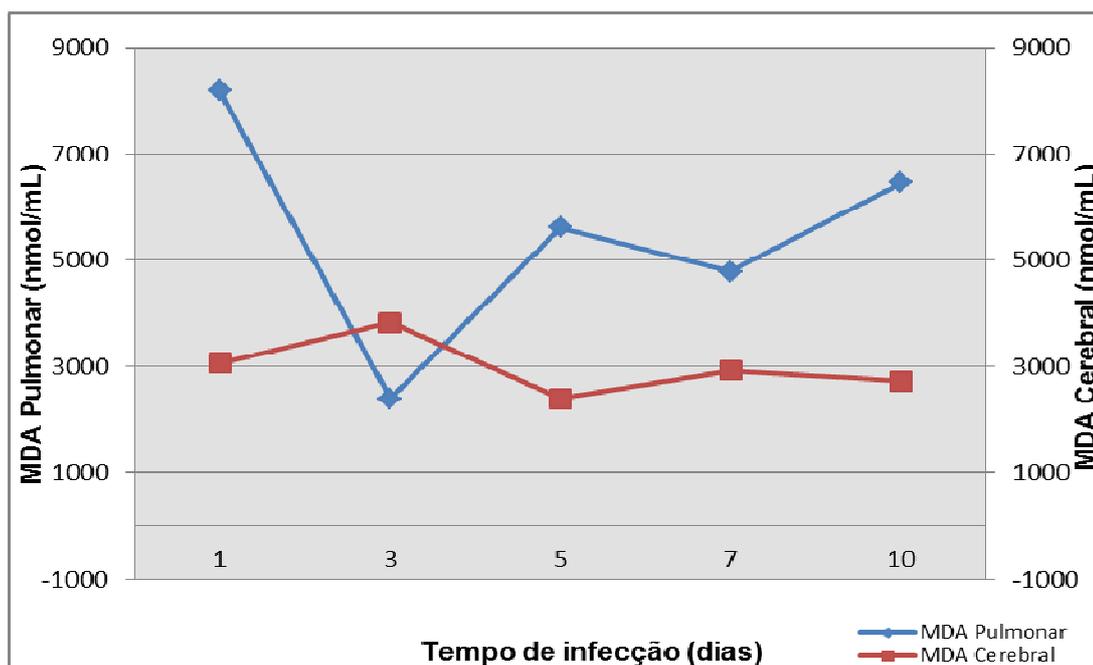


Figura 52: Comportamento do Malondialdeído (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com N-acetilcisteína.

Tabela 26: Valores de MDA e significância estatística no grupo suplementado com N-acetilcisteína para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | MDA (nmol/mL) |           | p valor*               |
|------------------|---------------|-----------|------------------------|
|                  | PULMÃO        | CÉREBRO   |                        |
| 1                | 8181±4184     | 3060±1195 | 0,0017                 |
| 3                | 2399±824      | 3819±773  | 0,0032                 |
| 5                | 5613±1749     | 2392±452  | 2,388x10 <sup>-5</sup> |
| 7                | 4778±979      | 2926±427  | 0,0006                 |
| 10               | 6456±1868     | 2721±748  | 0,0011                 |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

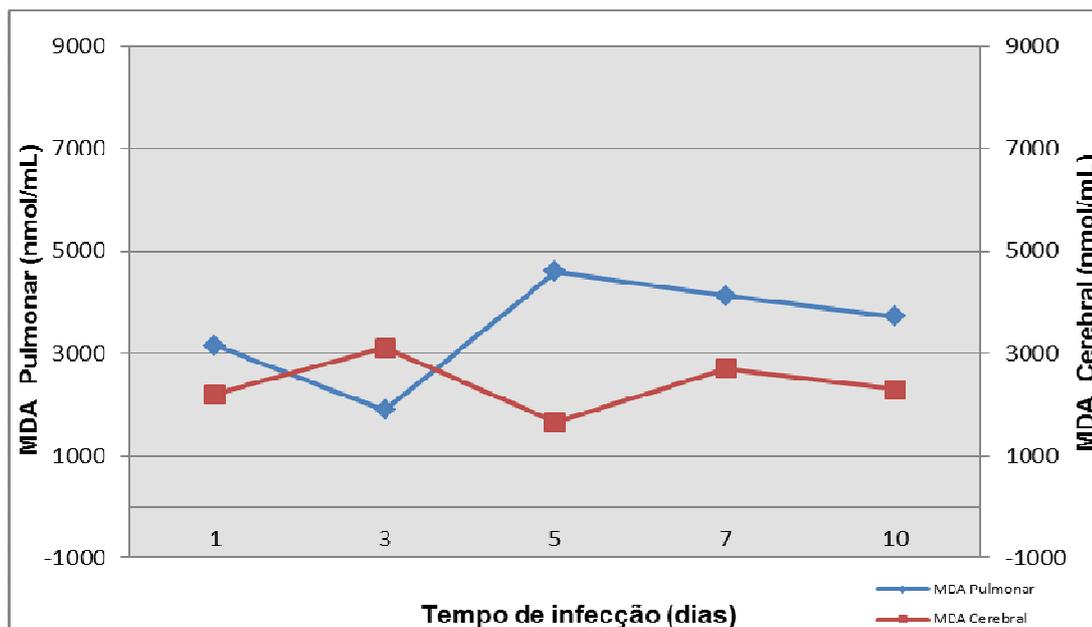


Figura 53: Comportamento do Malondialdeído (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com *Agaricus sylvaticus*.

Tabela 27: Valores de MDA e significância estatística no grupo suplementado com *Agaricus sylvaticus* para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | MDA (nmol/mL) |           | p valor* |
|------------------|---------------|-----------|----------|
|                  | PULMÃO        | CÉREBRO   |          |
| 1                | 3153±1750     | 2206±169  | 0,1256   |
| 3                | 1895±729      | 3100±437  | 0,0005   |
| 5                | 4591±2656     | 1648±542  | 0,0029   |
| 7                | 4125±1116     | 2699±742  | 0,0094   |
| 10               | 3721±1168     | 2298±1142 | 0,1084   |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

### 5.3.5.3- Correlação entre NO Pulmonar e Cerebral

As figuras 54, 55, 56 e 57 mostram o comportamento do NO nos tecidos pulmonar e cerebral no grupo de animais controles e de animais infectados com *P. berghei* e suplementados com antioxidantesdo em um período de estudo de 10 dias. As tabelas 28, 29, 30 e 31 mostram os valores de NO para pulmão e cérebro e a significância estatística dessa relação.

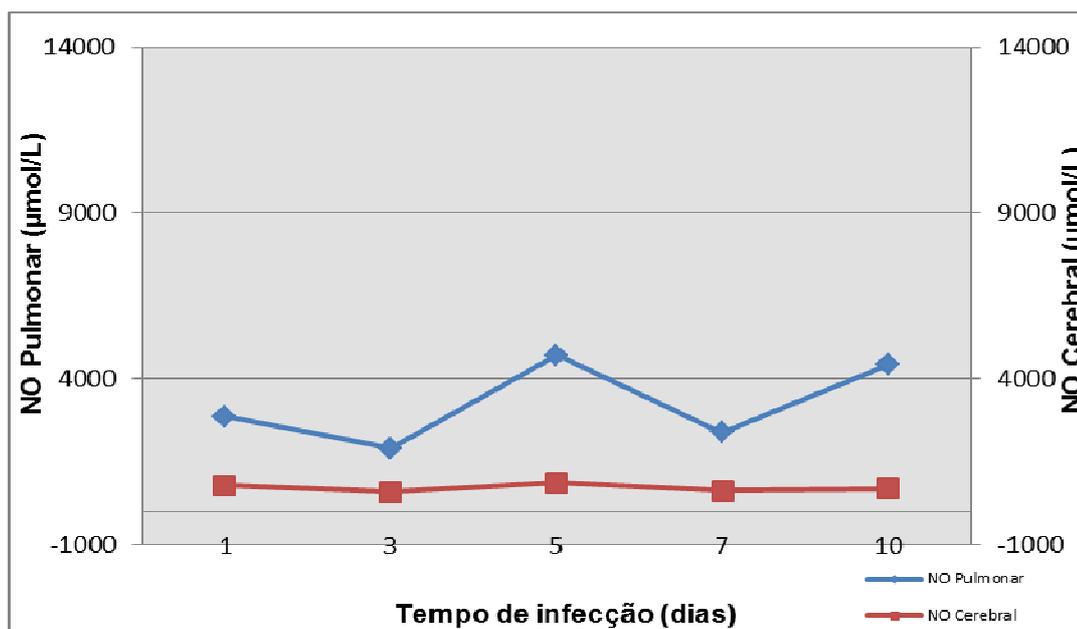


Figura 54: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle positivo.

Tabela 28: Valores de NO e significância estatística no grupo controle positivo para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | NO (μmol/L) |         | p valor*               |
|------------------|-------------|---------|------------------------|
|                  | PULMÃO      | CÉREBRO |                        |
| 1                | 2856±961    | 776±29  | 5,749x10 <sup>-5</sup> |
| 3                | 1907±1535   | 700±31  | 0,0406                 |
| 5                | 4719±3466   | 861±47  | 0,0044                 |
| 7                | 2379±1695   | 619±16  | 0,00187                |
| 10               | 4419±1922   | 684±25  | 0,0002                 |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

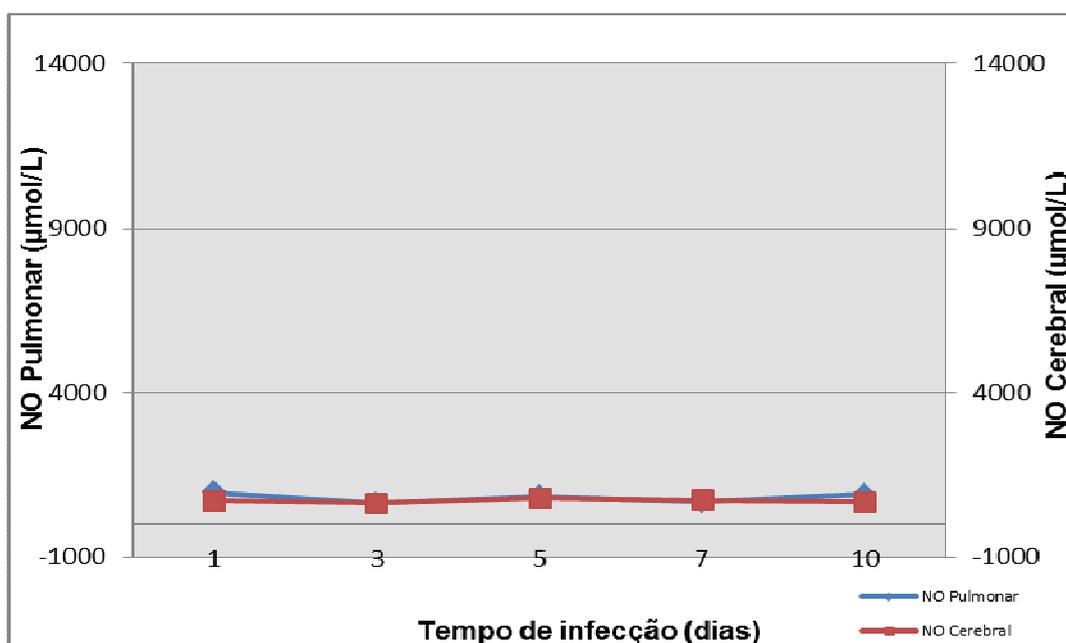


Figura 55: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle negativo.

Tabela 29: Valores de NO e significância estatística no grupo controle negativo para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | NO (μmol/L) |         | p valor*              |
|------------------|-------------|---------|-----------------------|
|                  | PULMÃO      | CÉREBRO |                       |
| 1                | 952±176     | 706±269 | 0,0353                |
| 3                | 628±126     | 628±175 | 0,9995                |
| 5                | 834±367     | 782±347 | 0,7593                |
| 7                | 663±99      | 719±234 | 3,01x10 <sup>-5</sup> |
| 10               | 906±312     | 674±164 | 0,034                 |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

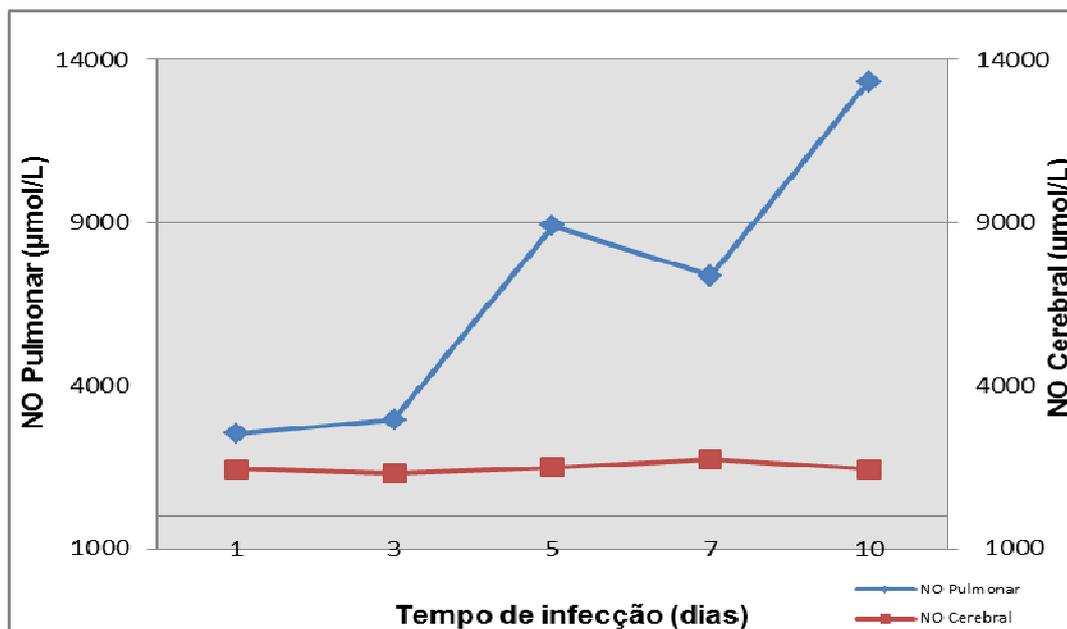


Figura 56: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com N-acetilcisteína.

Tabela 30: Valores de NO e significância estatística no grupo suplementado com N-acetilcisteína para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | NO (μmol/L) |          | p valor*               |
|------------------|-------------|----------|------------------------|
|                  | PULMÃO      | CÉREBRO  |                        |
| 1                | 2517±2473   | 1443±480 | 0,1942                 |
| 3                | 2955±1812   | 1304±287 | 0,0162                 |
| 5                | 8906±3963   | 1501±248 | 1,696x10 <sup>-5</sup> |
| 7                | 7369±1501   | 1741±494 | 7,424x10 <sup>-7</sup> |
| 10               | 13340±8980  | 1429±95  | 0,0165                 |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

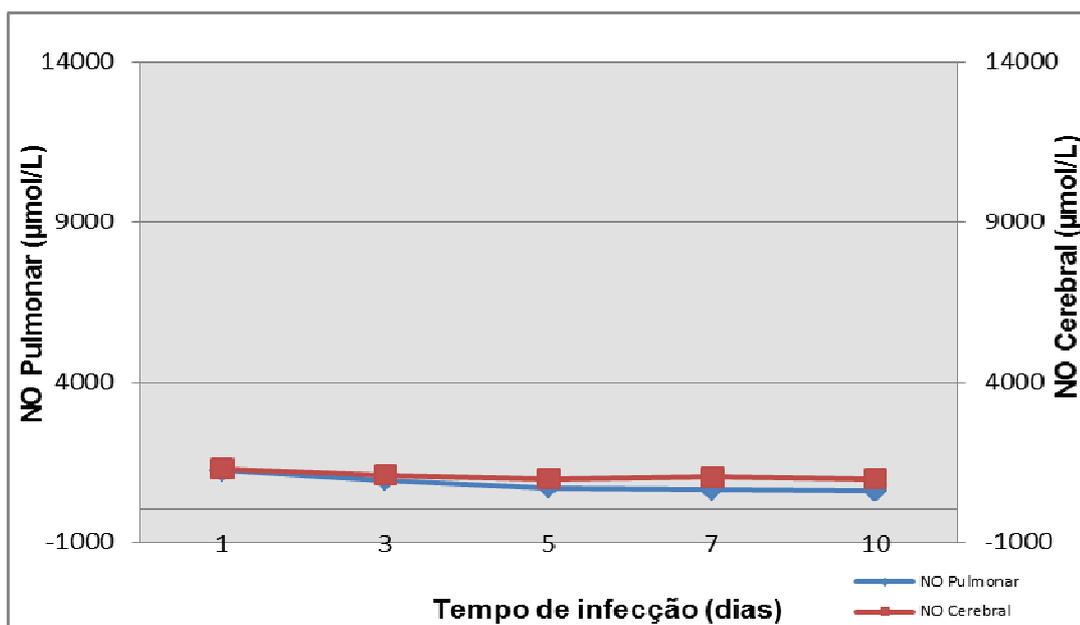


Figura 57: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com *Agaricus sylvaticus*.

Tabela 31: Valores de NO e significância estatística no grupo suplementado com *Agaricus sylvaticus* para pulmão e cérebro.

| Dias de Infecção | NO (μmol/L) |          | p valor* |
|------------------|-------------|----------|----------|
|                  | PULMÃO      | CÉREBRO  |          |
| 1                | 1236±492    | 1289±154 | 0,7495   |
| 3                | 973±423     | 1095±55  | 0,4347   |
| 5                | 732±372     | 977±67   | 0,1402   |
| 7                | 648±158     | 1032±176 | 0,0007   |
| 10               | 608±173     | 982±130  | 0,0091   |

\* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

## 6- DISCUSSÃO

A malária é uma doença de importância global, no entanto, os mecanismos que desencadeiam a sua patogenia e o aparecimento de formas graves da doença não estão completamente elucidados. Do mesmo modo, o papel do estresse oxidativo na fisiopatogenia da malária ainda não está claro e tem sido alvo de diversos estudos, pois alguns pesquisadores tem demonstrado um papel protetor (GILLMAN *et al.*, 2004; HEMMER *et al.*, 2005; TRIVEDI *et al.*, 2005; GUHA *et al.*, 2006), enquanto outros sugerem sua relação com a patogenia da doença (PABÓN *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2008, JARAMILO *et al.*, 2005; DEY *et al.*, 2009). Contudo, estudos recentes demonstram que a geração de ROS, com estresse oxidativo associado, tem um papel crucial no desenvolvimento das complicações sistêmicas da malária. Além disso, também se discute o papel do óxido nítrico na fisiopatogenia da doença e das defesas antioxidantes com o intuito de debelar a infecção (CLARK *et al.*, 2004; PINO *et al.*, 2005; YEO *et al.*, 2007; YEO *et al.*, 2008; PENET *et al.*, 2008; DHANGADAMAJHI *et al.*, 2009; HERBAS *et al.*, 2010).

Desse modo, as principais complicações da doença são malária cerebral, edema pulmonar agudo e anemia severa (VAN DEN STEEN *et al.*, 2010). Paralelamente, as ROS produzidas durante a infecção malárica têm sido correlacionadas com a malária cerebral e frequentemente associadas com secreção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , as quais são fatores estimuladores da produção de ROS, ocasionando um cenário complexo de interações responsáveis pelas alterações fisiopatológicas da doença, tais como o edema cerebral nos casos de malária grave. Adicionalmente, a peroxidação lipídica produz altos níveis de MDA no líquido céfalo-raquidiano (LCR) de sobreviventes em casos de malária cerebral (PABÓN *et al.*, 2003). Outra complicação grave da malária, o edema pulmonar, é caracterizado por um quadro clínico inicial de síndrome da angústia respiratória aguda (TAYLOR *et al.*, 2006).

Assim, este trabalho se propôs a investigar os efeitos da suplementação com antioxidantes e estimar seus potenciais benefícios sobre as alterações oxidativas cerebrais e pulmonares em modelo experimental de malária causada pelo *Plasmodium berghei*. Desse modo, foram utilizados 200 camundongos da espécie *Mus musculus* divididos randomicamente em 4 grupos: Controle Negativo (animais sham); Controle Positivo (animais inoculados intraperitonealmente com *P. berghei*);

N-acetilcisteína (animais inoculados intraperitonealmente com *P. beghei* e suplementados com N-acetilcisteína); e Cogumelo *Agaricus sylvaticus* (animais inoculados intraperitonealmente com *P. beghei* e suplementados com *Agaricus sylvaticus*).

De acordo com o período de estudo, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de pulmão e cérebro foram coletadas para avaliação do estresse oxidativo e defesa antioxidante, bem como foram realizados esfregaços sanguíneos para avaliação da parasitemia e correlação com outros parâmetros. Assim, os marcadores utilizados foram o malondialdeído (MDA) – indicador da peroxidação lipídica; capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) – quantifica a capacidade antioxidante total da amostra; e metabólitos do óxido nítrico (Nitritos e Nitratos).

Neste cenário, dentre os resultados obtidos cabe destacar, primeiramente, a parasitemia que progride em escala temporal nos grupos controles positivos (Fig. 15), ou seja, quanto maior é o tempo de infecção, maior é o grau de parasitemia. Estas considerações em relação a infecção e progressão da parasitemia estão de acordo com os achados de outros autores que utilizaram o mesmo modelo experimental de malária proposto neste trabalho (COUPER *et al.*, 2007; AGBOR-ENOH *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2010; EIPHANIO *et al.*, 2010; MOREIRA, 2010). Além disso, nos grupos de animais infectados e suplementados com NAC e *Agaricus sylvaticus*, houve um comportamento semelhante ao dos controles positivos, no entanto, ocorreu uma diminuição significativa da parasitemia ( $p < 0,01$  do 7º ao 10º dia de infecção, além de apresentar uma velocidade de progressão menor que o grupo controle positivo. Este dado sugere que o parasita pode se desenvolver em um ambiente pro-oxidante e que a suplementação com antioxidantes seja desfavorável para a progressão da doença. No entanto, estudos posteriores sobre a suplementação com esses antioxidantes são necessários para avaliar seus efeitos no *clearance* parasitário dos animais infectados.

Os resultados e ponderações subsequentes avaliam o perfil do estresse oxidativo e da defesa antioxidante total nos tecidos pulmonar e cerebral e suas correlações com a parasitemia, buscando estimar as potencialidades benéficas da suplementação com N-acetilcisteína e *Agaricus sylvaticus* neste modelo experimental de estudo.

## 6.1- COMPORTAMENTO OXIDATIVO PULMONAR

As principais complicações da malária no tecido pulmonar são, inicialmente, a síndrome da angústia respiratória aguda, acompanhada, nas formas mais severas da doença, de edema pulmonar agudo (TAYLOR, 2006; VAN DEN STEEN *et al.*, 2010). Estes casos graves podem ser resultado da citoaderência, particularmente, peculiar ao *P. falciparum*, onde é provável que ocorra o fenômeno da síndrome de isquemia e reperfusão (POUVELLE *et al.*, 2007 e PHIRI *et al.* 2009). As funções pulmonares alteradas também têm sido observadas em pessoas que retornam de áreas endêmicas de malária vivax e incluem a troca gasosa alveolar reduzida e aumento da atividade de células leucocitárias pulmonares, contudo é sabido que o prejuízo na transferência gasosa resulta da inflamação na membrana dos capilares alveolares e/ou sequestro de leucócitos ou de hemácias parasitadas na microvasculatura pulmonar. Clinicamente, as lesões aparentes no pulmão, particularmente, na malária vivax, se desenvolvem comumente depois do início do tratamento antimalárico e isso pode ser predominantemente devido a resposta inflamatória (PRICE *et al.*, 2007; ANSTEY *et al.*, 2007).

O edema pulmonar é grave e suas manifestações podem ser fatais em pessoas com malária falciparum. Embora esta síndrome seja uma manifestação de malária grave e complicada, isso corresponde a uma gama de lesões pulmonares parenquimais e precisa de uma definição mais apurada. No entanto, muitas complicações da malária grave podem contribuir para a gênese da hipoxemia, incluindo o sequestro de hemácias infectadas nos vasos pulmonares (GACHOT *et al.*, 1995). De fato, o sequestro de eritrócitos infectados também ocorre no pulmão de camundongos infectados com o *P. berghei* e é mediado por CD36 e contribui para patologia pulmonar, assim ratos deficientes de CD36 apresentam edema pulmonar parcialmente diminuído na infecção pelo *P. berghei* ANKA. Desse modo, o modelo animal mais comumente usado para o estudo da patogênese da malária pulmonar é a infecção de camundongos, tais como o Swiss, com o *P. berghei* ANKA, em que o envolvimento de ROS, IFN- $\gamma$ , IL-12, ICAM-1, CD40 e linfotóxina-  $\alpha$  já foram relatados (VAN DEN STEEN *et al.*, 2010).

O edema pulmonar observado em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* NK65 é caracterizada pelo aumento do peso pulmonar, da permeabilidade vascular, pelo edema alveolar rico em proteínas, formação de

membrana hialina, hemorragias intra-alveolares e aumento do número de monócitos/macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Além disso, a similaridade entre o edema pulmonar humano e o descrito acima inclui alto grau de letalidade e hipoalbuminemia, a qual é considerada um fator agravante em pacientes com malária falciparum (VAN DEN STEEN *et al.*, 2010).

Além disso, estudos mostram o aumento do número de monócitos sequestrados nos vasos pulmonares, paralelamente ao aumento da produção de ROS. Assim, com o aumento do número de monócitos na vasculatura pulmonar, é possível que o aumento da produção de ROS e citocinas nos capilares alveolares possa ser responsável pelo desenvolvimento do edema pulmonar agudo na malária (BECKER *et al.* 2004).

Adicionalmente, o radical superóxido, estimulado por substâncias envolvidas no processo inflamatório como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e o lipopolissacarídeo via aumento da NADPH-oxidase, também estão presentes na síndrome da angústia respiratória aguda, o que parece ter relação com o aumento da síntese de óxido nítrico (MUZAFFAR *et al.*, 2003).

Desta forma, a observação das alterações pulmonares neste modelo experimental de malária nos permite investigar a presença do estresse oxidativo, assim como, a sua correlação com a gravidade da doença e com a intervenção de antioxidantes, podendo fornecer uma nova perspectiva no tratamento na doença, especialmente em crianças que vivem em áreas endêmicas.

Nesse sentido, os resultados em amostras pulmonares mostraram que a capacidade antioxidante total aumenta durante a infecção (Fig. 16), pois o grupo controle positivo apresentou valores significativamente elevados de TEAC no 3º e no 10º dias de infecção ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente), se comparado ao grupo controle negativo, o que sugere que ocorra uma mobilização de defesa antioxidante endógena, como um provável mecanismo de defesa frente ao estresse oxidativo gerado durante a infecção malárica. De fato, na tentativa de evitar o estresse oxidativo, o microambiente pulmonar parece contar com uma forte defesa antioxidante. As substâncias, potencialmente, responsáveis por esse processo são: as proteínas A1, A2 e B, que fazem parte do surfactante alveolar (SAXENA *et al.*, 2005); as enzimas catalase (CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU *et al.*, 2003) e superóxido dismutase (OURY *et al.*, 2002; KINSELLA *et al.*, 2005); e a GSH

(RAHMAN e MacNEE, 2000). Cada uma dessas substâncias parece exercer papel protetor nas lesões pulmonares, em especial nas síndromes de deficiência respiratória.

Do mesmo modo, o TEAC dos animais infectados e suplementados com *Agaricus sylvaticus* foi bastante superior em relação aos outros grupos ( $p < 0,01$ ) durante todo o período de infecção e aumentou de maneira progressiva, mas isso não se refletiu em um grau significativamente menor na parasitemia, exceto no 10º dia de infecção. Além disso, os grupos de animais suplementados com N-acetilcisteína apresentaram capacidade antioxidante maior se comparado aos grupos controle negativo no 3º, 7º e 10º dias de infecção ( $p < 0,01$ ) e também ao grupo controle positivo no 3º e no 7º dias ( $p < 0,01$ ). Assim, a capacidade antioxidante total, neste modelo experimental de malária, encontrou-se elevada quando os animais foram suplementados com antioxidantes, especialmente com *Agaricus sylvaticus*.

O aumento de TEAC no 10º dia de infecção nos grupos de animais suplementados com antioxidantes ocorreu simultaneamente à diminuição da parasitemia nesse período, particularmente nos animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* ( $p < 0,01$ ), o que pode sugerir que a existência de um nível determinado de defesa antioxidante a partir do qual a parasitemia não progride. Assim, é provável que, uma vez que o organismo crie um ambiente antioxidante desfavorável ao desenvolvimento do parasita e diminuam a parasitemia e as lesões oxidativas, a doença possa evoluir para resolução, porém isso não foi testado e deve ser explorado em estudos posteriores.

Paralelamente, o MDA pulmonar mostrou-se elevado com a evolução da doença, como observado no grupo de animais infectados do 5º ao 10 dias de estudo, se comparado ao grupo controle negativo ( $p < 0,01$ ; Fig.17) para o mesmo período e do 1º para o 10º dia de infecção (controle positivo;  $p = 0,0002$ ; Fig. 17). Isso mostra que a peroxidação lipídica está relacionada aos casos graves de malária pulmonar, como observado pelos níveis de MDA. É importante notar que, em resposta à infecção causada pelos *Plasmodium*, o mecanismo de defesa natural do organismo do hospedeiro ativa fagócitos (macrófagos e neutrófilos). Estes, por sua vez, geram grande quantidade de ROS, ocasionando um desequilíbrio entre a formação de espécies oxidantes e moléculas antioxidantes. Isso desencadeia o

estresse oxidativo, que pode ser um importante mecanismo de defesa do hospedeiro durante a infecção, mas podem levar a apoptose de células endoteliais e ao agravamento da doença, como sugerido por Trivedi *et al.* (2005) e Hemmer *et al.* (2009).

Por outro lado, não houve diferença significativa nos grupos de animais suplementados do 1º para o 10º dia de estudo (Fig.17), provavelmente decorrente dos valores mais elevados de MDA apresentados no primeiro dia de infecção em ambos os grupos. No entanto, quando analisamos a evolução da doença entre o 3º e o 10º dia, observamos significância estatística ( $p=0,0001$  para NAC e  $p=0,002$  para *Agaricus sylvaticus*). Além disso, o grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína apresentou níveis maiores de MDA em relação aos animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* no 1º e no 10º dias de infecção ( $p<0,01$ ) e semelhantes aos animais controles positivos (exceto no 1º dia de infecção), podendo sugerir que NAC seja ineficiente para reduzir as lesões oxidativas pulmonares ou que atue induzindo o estresse oxidativo para tentar debelar a infecção, já que houve diminuição da parasitemia no 10º dia de infecção, através de um mecanismo não esclarecido e que, o *Agaricus sylvaticus* tenha efeitos semelhantes aos de NAC, podendo reduzir estas lesões a longo prazo em relação a NAC ( $p<0,01$ ; tabela 3) e diminuir sensivelmente a parasitemia (10º dia de infecção;  $p<0,01$  em relação ao grupo controle positivo). Apesar dos níveis de MDA nos grupos de animais suplementados com antioxidantes tenham sido semelhantes aos valores de MDA do grupo controle positivo, é importante notar que houve um aumento significativo na relação TEAC:MDA destes grupos, se comparado ao controle positivo, especialmente nos animais tratados com *Agaricus sylvaticus*, o que pode ser importante no mecanismo de defesa antioxidante durante a infecção.

Em relação ao óxido nítrico, o grupo de animais infectados (controle positivo) apresentou um aumento significativo nos níveis de NO do 5º ao 10º dias de infecção ( $p<0,05$ ; Fig. 18), se comparado ao grupo controle negativo para o mesmo período de estudo, o que pode evidenciar que o NO pulmonar esteja envolvido na defesa do hospedeiro durante a infecção malárica. Estes achados corroboram com alguns estudos que descrevem um papel protetor do NO para o desenvolvimento da malária grave, podendo ser útil na terapia adjuvante da malária (Yeo *et al.*, 2007; Cabrales *et al.*, 2011). No entanto, do início ao final do período de estudo, não foi observado

aumento estatisticamente significativo nos níveis de NO ( $p=0,0783$ ; tab. 4), podendo indicar que outra molécula pró-oxidante seja responsável pelo estresse oxidativo gerado, como por exemplo, a formação do radical  $\text{ONOO}^\bullet$  a partir da reação entre o NO e o  $\text{O}_2^\bullet$ , provavelmente produzido por intensificação do processo inflamatório ou por fenômeno de isquemia e reperfusão, como resultado da citoaderência das hemácias parasitadas ao endotélio dos capilares pulmonares. Outra possibilidade seria uma depleção nos níveis de NO devido a hemólise intravascular, que levaria também a hipertensão pulmonar, como tem sido estudado por Janka *et al.* (2010).

Os animais suplementados com N-acetilcisteína apresentaram valores de NO pulmonar significativamente elevados em relação ao *Agaricus sylvaticus* ( $p<0,01$ ) do 3º ao 10º dia de estudo e também em relação ao grupo controle positivo do 5º ( $p<0,05$ ) ao 10 dia de infecção ( $p<0,01$ ). Isto pode ser devido a possibilidade de NAC estar relacionada à indução da síntese de NO para debelar a infecção via estresse oxidativo (10º dia de infecção;  $p<0,01$  em relação aos grupos controle positivo) no interior das hemácias, como observado pela diminuição da parasitemia do 7º ao 10 dia de infecção (Fig.15), onde os níveis de NO pulmonar atingiram níveis bastante elevados, no entanto, não existe um limiar de concentração de NO definido a partir do qual possa haver remissão da parasitemia. De fato, é sabido que NAC pode agir como agente redutor devido ao grupo tiol e facilita a expressão da iNOS induzida por IL-1 $\beta$  nas células vasculares em ratos (JIANG *et al.*, 1999; JIANG *et al.*, 2000; MAJANO *et al.*, 2004; FERNHOFF *et al.*, 2009).

Em crianças com malária grave, N-acetilcisteína aumenta a taxa de normalização da lactato plasmática por um mecanismo dependente de TNF $\alpha$ , possivelmente pelo aumento da deformidade das hemácias ou por aumento da GSH (WATT *et al.*, 2002). Portanto, agentes redutores, tais como a N-acetilcisteína, podem ter um papel terapêutico nas complicações da malária e podem reduzir a obstrução microvascular ao fluxo sanguíneo. O edema pulmonar agudo é uma manifestação comum em crianças e pode ser especialmente em mulheres grávidas (TAYLOR e WHITE, 2002).

Assim, recentes estudos mostram que o aumento na produção de NO tem mostrado efeitos benéficos na infecção malárica, mas, apesar de ainda existem muitas controvérsias a respeito disso, estes efeitos podem ser devido a inibição da citoaderência, através da diminuição da expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-

selectina, que estão envolvidos na citoaderência e sequestro microvascular de hemácias parasitadas e diminuem a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos (DHANGADAMAJHI *et al.*, 2009).

Por outro lado, se esta indução for exacerbada, pode gerar altas concentrações de NO, associado ao aumento de MDA, pode contribuir para a gravidade da doença a nível pulmonar. Somando-se a isso, Zhu *et al.* (2005) observaram que os Glicosilfosfatidilinositóis (GPIs) do *P. falciparum* induz a expressão da iNOS e podem regular positivamente a expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular, provavelmente implicando na internalização do parasita às hemácias. Adicionalmente, Anstey *et al.* (2007) estudando adultos com malária vivax e malária falciparum não-complicada, observaram que ocorre uma redução no volume dos capilares pulmonares devido ao sequestro das hemácias parasitadas nos capilares alveolares e aos leucócitos nos vasos pulmonares e que as lesões prolongadas aos capilares alveolares são devido a resposta inflamatória para destruir o parasita ou à reperfusão.

Curiosamente, os animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* apresentaram níveis de NO semelhantes aos do controle negativo, o que sugere que durante a infecção o *Agaricus sylvaticus* atue inibindo a síntese de NO através de um mecanismo intrínseco ou realize sua ação através de um outro mecanismo de defesa adverso ao de NAC, mas não significativamente melhor, a partir da varredura de NO, favorecendo a criação de um ambiente antioxidante desfavorável ao desenvolvimento e internalização do parasita nas hemácias e, provavelmente diminuindo a apoptose, contribuindo para a integridade das células nos capilares pulmonares. Assim, é provável que possam existir dois mecanismos diferentes de defesa do hospedeiro para cada antioxidante estudado durante a infecção.

Estes dados estão de acordo com Dimmeler *et al.* (1997) que observaram que a apoptose induzida nas células endoteliais por TNF- $\alpha$  foi diminuída após a inibição de iNOS por N-monometil-L-arginina (L-NMMA), o que conferiu proteção às células endoteliais pela inibição da apoptose. Além disso, Pino *et al.* (2005) observam que a adesão de hemácias parasitadas ao endotélio pulmonar humano, que ocorre durante o estágio eritrocítico da malária, pode estar sendo regulada por TNF- $\alpha$ , citocina indutora da expressão das enzimas iNOS; sugerindo que a inibição da síntese de NO possa proteger as células endoteliais pulmonares.

### 6.1.1- Correlação Pulmonar e a Suplementação com Antioxidantes

No estudo de correlação pulmonar, os resultados mostraram que é provável que, à medida que aumenta a concentração de MDA, como resultado da peroxidação lipídica, ocorra a indução para a síntese de moléculas antioxidantes pelas células pulmonares na tentativa de diminuir as lesões oxidativas e restabelecer o equilíbrio redox durante a infecção pelo *P. berghei*, pois ocorreu correlação positiva moderada e altamente significativa ( $r= 0,4766$  e  $p =0,0028$ ) entre MDA e TEAC no grupo controle positivo (Fig. 19b). Isso mostra que a capacidade antioxidante total aumenta à medida que as lesões oxidativas aumentam, independente da suplementação com antioxidantes. Estes dados estão de acordo com Moreira (2010), que observou que no tecido pulmonar ocorre aumento concomitante de TEAC, uma vez que aumentaram os níveis de MDA em camundongos infectados com *P. berghei*.

Do mesmo modo, no grupo de animais suplementados com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* (Fig. 19e), há uma correlação positiva moderada e altamente significativa ( $r= 0,5381$  e  $p= 0,0004$ ) entre MDA e TEAC, provavelmente devido ao fato de que o *Agaricus sylvaticus* tenha a propriedade de aumentar de maneira mais pronunciada a defesa antioxidante nos animais de estudo, por outro lado, não houve significância estatística ( $p= 0,7298$ ) entre MDA e TEAC no grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína, no entanto, se considerarmos os animais do 3° ao 10° dias infecção, há uma tendência a significância ( $p=0,0662$ ). Em todo caso, isso reforça a idéia de que NAC tenha uma atividade ineficiente em reduzir as alterações oxidativas pulmonares ou que atue induzindo o estresse oxidativo para impedir o desenvolvimento do parasita.

De fato, no estudo de correlação entre MDA e NO pulmonar, os resultados mostraram que houve uma correlação positiva moderada e altamente significativa entre os parâmetros ( $r=0,5158$  e  $p=0,0008$ ) no grupo controle positivo (Fig. 21b). Portanto, isto sugere que à medida que aumentaram as concentrações de MDA, aumentaram também os níveis de NO, provavelmente para combater a infecção. Paralelamente, Erel *et al.* (1997) investigaram estresse oxidativo e estado antioxidante plasmático em eritrócitos de pacientes com malária vivax e observaram que o estresse oxidativo é uma importante via de defesa contra a infecção. Por outro

lado, no grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína, não houve uma correlação significativa ( $p=0,0843$ ) entre MDA e NO, mas é provável que NAC esteja associada a indução da produção de NO pulmonar como forma de defesa via estresse oxidativo, pois quando consideramos os animais do 3° ao 10° dias de infecção, ocorreu forte correlação positiva e altamente significativa entre os parâmetros ( $r=0,7159$ ;  $p=0,0001$ ).

No estudo da correlação entre TEAC e NO pulmonar, foi observado que no grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína (Fig 23d), houve uma correlação positiva moderada e altamente significativa ( $r=0,5769$  e  $p=0,0002$ ) entre os parâmetros. Isto reforça a idéia de que NAC esteja relacionada à indução NO e isso está ligado ao aumento da capacidade antioxidante total. Paralelamente, NAC pode prevenir ou reverter efeitos prejudiciais do heme e agir contra as lesões oxidativas no citoesqueleto de eritrócitos (STRAFACÉ *et al.*, 2002). Por outro lado, no grupo de animais suplementados com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* (Fig 23e), há uma correlação negativa moderada e significativa ( $r= -0,3931$  e  $p=0,012$ ) entre TEAC e NO, o que reforça a ideia de que o *Agaricus sylvaticus* pode estar envolvido na inibição da síntese e/ou diminuição da concentração do NO pulmonar, com aumento da capacidade antioxidante total do hospedeiro e diminuindo sensivelmente as lesões oxidativas pulmonares.

Em relação ao estudo da Parasitemia com o MDA pulmonar, houve uma correlação moderadamente positiva e altamente significativa ( $r=0,5839$  e  $p<0,0001$ ) entre os parâmetros no grupo controle positivo (Fig. 25b), o que mostra que à medida que a parasitemia progride, aumentam os níveis de MDA, resultado das lesões oxidativas no tecido pulmonar. Isso reforça os nossos achados de que a peroxidação lipídica está realmente envolvida nas complicações da malária pulmonar. Paralelamente, Stocker *et al.* (1985) observaram que o aumento da carga parasitária nas hemácias de ratos parasitados com *Plasmodium vinckei vinckei* foi acompanhado por um aumento na produção de MDA plasmático, sugerindo que o estresse oxidativo é mediado pelo MDA e ocorre em todas as hemácias durante a infecção malárica.

Do mesmo modo, uma vez que, os animais são suplementados com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* (d), há uma moderada correlação positiva e altamente significativa ( $r=0,4265$  e  $p=0,0067$ ) entre Parasitemia e MDA, sugerindo que o

*Agaricus sylvaticus* provavelmente teria pouca atividade de prevenção da peroxidação lipídica e diminuição das lesões oxidativas a nível pulmonar, no entanto sensivelmente maior do que NAC.

O comportamento acima descrito para o MDA ocorre paralelamente a um aumento na capacidade antioxidante total, com a progressão da parasitemia (Fig. 27), na tentativa de diminuir o estresse oxidativo gerado durante a infecção, com ou sem a administração de antioxidantes, uma vez que em todos os grupos individualmente houve uma correlação positiva forte e altamente significativa entre Parasitemia e TEAC: (b) controle positivo ( $r=0,6987$  e  $p<0,0001$ ); (c) grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína ( $r=0,8040$  e  $p<0,0001$ ); (d) grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* ( $r=0,8242$  e  $p<0,0001$ ). Isto sugere veementemente que a medida que aumenta a parasitemia, ocorre a mobilização de antioxidante endógenos pelas células pulmonares, aumentando a capacidade antioxidante total para tentar combater a infecção e que a suplementação com antioxidantes promove uma reação mais pronunciada.

Em relação a correlação entre parasitemia e NO pulmonar (Fig. 29), os resultados mostraram que, no grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína (Fig. 29c), houve uma correlação positiva moderada e altamente significativa ( $r=0.5568$  e  $p=0.0003$ ), o que mostra, de fato, que NAC pode estar relacionada à indução da síntese de NO para debelar a infecção via estresse oxidativo. Adicionalmente, Fritsche *et al.* (2001) observaram em culturas celulares que a adição de desferrioxamina (DFO) aumentou a síntese de NO e a morte dos parasitas em hemácias infectadas pelo *P. falciparum*. Assim, os efeitos de DFO no *clearance* do parasita parecem ser devido ao aumento da produção de NO.

Por outro lado, no grupo de animais suplementados com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* (Fig. 29d), houve uma correlação negativa moderada e altamente significativa ( $r=-0,4410$  e  $p=0,0044$ ) entre parasitemia e NO. Assim, provavelmente o *Agaricus sylvaticus* esteja relacionado a inibição da síntese de NO pulmonar e/ou diminuição das concentrações, à medida que progride a parasitemia, através de uma via antioxidante de defesa contra a infecção. Portanto, o *Agaricus sylvaticus* e a NAC podem atuar por dois mecanismos distintos para tentar inibir o desenvolvimento do parasita. De um lado, a inibição da síntese de NO pelo *Agaricus sylvaticus* parece ser um pouco mais relevante do que NAC e provavelmente exerce

seus efeitos a longo prazo, a partir da inibição da síntese de NO durante a infecção, fazendo com que os níveis de NO sejam equivalentes aos valores basais e diminuindo a apoptose endotelial e a internalização do parasita nas hemácias, no entanto, outras moléculas podem ser consideradas, tais como o  $\text{ONOO}^-$ , que pode ser o responsável pelo agravamento da doença, mesmo que os animais sejam suplementados com o *Agaricus sylvaticus*. Por outro lado, a indução da síntese de NO estimulada pela NAC também apresenta algum efeito benéfico no *clearance* parasitário e pode melhorar o fluxo microcirculatório, mas parece ser dependente de altas concentrações de NO, o que pode culminar no agravamento da doença, pois não existe um limiar de concentração de NO definida a partir da qual seus efeitos passam a ser nocivos ao hospedeiro. Ao mesmo tempo, NAC pode atuar na varredura de ROS gerados durante a infecção e aumentar a capacidade antioxidante total.

## 6.2- COMPORTAMENTO OXIDATIVO CEREBRAL

A malária cerebral é a maior causa de morte durante a infecção pelo *P. falciparum* e é caracterizada pelo sequestro de hemácias infectadas nos microvasos cerebrais. A maioria das moléculas implicadas na adesão das hemácias infectadas nas células endoteliais já foram descritas, no entanto o resultado da interação das hemácias infectadas com as células endoteliais é pouco compreendido (Jambou *et al.*, 2010). A Malária cerebral é manifestação mais grave da doença, caracterizada por forte cefaléia, hipertermia, vômitos, sonolência e convulsões (principalmente em crianças) e tem sido extensamente estudada; BOULOS *et al.*, 1993; LOU *et al.*, 2001; SIBMOOH *et al.*, 2004; PENET *et al.*, 2007). A malária grave é considerada como uma síndrome complexa que afeta muitos órgãos e altera o metabolismo. No caso particular da malária cerebral, que pode levar a coma e morte, é associada a hipertensão intracraniana grave causada pelo edema cerebral. No entanto, o efeito de novas terapias neuroprotetoras tem sido pouco estudadas (KAISER *et al.*, 2006).

Particularmente, a adesão de hemácias parasitadas ao endotélio vascular cerebral (citoaderência) culmina em migração exacerbada de leucócitos a fim de evitar a passagem do parasita ao tecido cerebral, o que parece ser mediado por

ativação da célula T (LEPENIES *et al.*, 2007) em resposta a apresentação do antígeno pela célula dendrítica (DE WALICK *et al.*, 2007). Dessa forma, o aumento da resposta inflamatória, que outrora parecia essencial para a eliminação do parasita, é agora, um potencial causador da malária cerebral, já que, aliado a citoaderência, promove isquemia e edema cerebral (PENET *et al.*, 2007; POUVELLE *et al.*, 2007).

De fato, a patogênese da malária cerebral envolve o sequestro do parasita na microvasculatura cerebral com hipóxia tecidual, lesões isquêmicas e resposta imune ao *P. falciparum* com a produção de citocinas e quimiocinas (JOHN *et al.*, 2008). Isto significa que as hemácias infectadas podem mimetizar a interação de leucócitos com as células endoteliais. Este processo é associado com a transferência de antígenos das células endoteliais, que podem ativar inadequadamente a resposta imune e com a abertura das junções intercelulares, que podem desencadear a diminuição de função da BHE durante a malária cerebral (JAMBOU *et al.*, 2010).

A síndrome de isquemia e reperfusão é uma importante causa de lesões neurológicas e esta agressão pode afetar a integridade e função neurológica, somando-se a isso, ROS, citocinas e amino-ácidos excitatórios podem contribuir para essas lesões neurológicas (BECKER *et al.*, 2004).

Portanto, lidar com complicações cerebrais não é fácil, já que o cérebro é um órgão com estrutura e fisiologia extraordinariamente complexas e funcionamento que revela inigualáveis sutilezas, o que pode ser observado em apenas uma de três características que, diferenciam as patologias cerebrais das patologias nos outros órgãos, uma vez que o sistema nervoso tem uma série de características anatômicas e fisiológicas que lhe são peculiares e que influenciam grandemente na forma como a doença se expressa, ou seja, características que conferem proteção contra uma determinada forma de ataque, podem aumentar a vulnerabilidade a um diferente tipo de agressão patológica (ROBBINS *et al.*, 1991). Como exemplo podemos citar estruturas como 1) o crânio – que protege contra o traumatismo mas possibilita o aumento da pressão intracraniana; 2) o liquor – que também protege contra traumatismo mas é o agente para o desenvolvimento da hidrocefalia e de disseminação dos microorganismos e células tumorais; 3) e a BHE que além de estabilizar o meio interno, no interior do parênquima, confere, juntamente com a

ausência de drenagem linfática, ao cérebro, um local privilegiado do ponto de vista imunológico, mas que no entanto, o torna suscetível ao acúmulo de edema.

Coincidentemente, o edema cerebral, assim como o pulmonar, parece determinar o quadro patológico da malária grave (KAISER *et al.*, 2006). No entanto, o aumento da pressão intracraniana é que, aparentemente, confere ao edema cerebral maior risco de morte. Tal anormalidade é advinda de um conjunto de fatores que podem atuar a fim de eliminar a infecção sem que haja a passagem do microorganismo para o tecido cerebral (ROBBINS *et al.*, 1991).

Portanto, para a compreensão da malária cerebral, a infecção de camundongos C57BL/6 com o *Plasmodium berghei* ANKA fornece um modelo experimental de malária cerebral que tem muitas características com a malária cerebral humana e tem sido amplamente usado para estudar os mecanismos envolvidos na malária cerebral. Assim, o sequestro de hemácias infectadas nos vasos cerebrais tem sido amplamente demonstrado em modelo experimental de malária, bem como o edema e as hemorragias cerebrais levam a morte de várias espécies de ratos em dias (VAN DEN STEEN *et al.*, 2010). Adicionalmente, muitos estudos mostram que *P. berghei* ANKA pode ser sequestrado *in vivo* em diferentes órgãos, além do cérebro (BAPTISTA *et al.*, 2010).

Nesse sentido, os resultados em amostras cerebrais mostraram que a capacidade antioxidante total aumenta durante a infecção (Fig. 31), pois os grupos controles positivos apresentaram níveis significativamente elevados de TEAC no 1º, 3º e 10º dias de infecção ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle negativo. Portanto, é provável que ocorra a mobilização da defesa antioxidante endógena do tecido cerebral na tentativa de proteger o hospedeiro da infecção, no entanto, apesar do cérebro apresentar uma capacidade antioxidante mais elevada na infecção, não houve um aumento sigificante de TEAC do 1º para o 10º dia de infecção ( $p = 0,1231$ ; Tab.11), o que poderia sugerir que o cérebro apresentasse mecanismos de defesa antioxidante menos eficientes do que o pulmão, no entanto, não é o que ocorre como observado pelos níveis de MDA cerebral, mostrando ser a capacidade antioxidante cerebral mais eficiente na prevenção da peroxidação lipídica em relação a pulmonar.

Paralelamente, os animais infectados e suplementados com antioxidantes apresentaram TEAC maior do que o grupo controle positivo no 3º, 5º e 7º dias de

infecção ( $p < 0,01$ ), mas isso não se refletiu em uma parasitemia menor, exceto no 10º dia de estudo. Além disso, o grupo NAC apresentou níveis significativos de TEAC no 3º dia de infecção ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo *Agaricus sylvaticus*, provavelmente ao fato de que NAC possa ter mais facilidade de transpor a BHE do que as moléculas antioxidantes presentes no *Agaricus sylvaticus*, fato este que pode estar relacionado a indução de NO pela NAC e não pelas propriedades antioxidantes. Nesse sentido o NO apresenta propriedades vasodilatadoras bem conhecidas e pode ser responsável pelo aumento da permeabilidade da BHE. Assim, no grupo de animais suplementados com o *Agaricus sylvaticus*, não houve uma elevação progressiva dos níveis de TEAC com a evolução da doença ( $p = 0,5519$ ; Tab.11), como foi observado no pulmão, o que sugere que as substâncias antioxidantes presentes no cogumelo *Agaricus sylvaticus* têm dificuldades de transpor a BHE.

Do mesmo modo, os valores de MDA no tecido cerebral aumentaram durante a infecção (Fig. 32), em relação ao controle negativo, no 1º ( $p < 0,05$ ) e no 3º ( $p < 0,01$ ) dias de infecção, o que evidencia que durante a infecção malárica ocorre peroxidação lipídica relevante a nível cerebral, no entanto, não houve aumento significativo nos níveis de MDA cerebral do 1º para o 10º dia de estudo ( $p = 0,0886$ ; Tab.12), apresentando um comportamento paralelo ao TEAC, o que mostra que mesmo ocorrendo lesões oxidativas, a defesa antioxidante não permitiu um aumento progressivo nos níveis de MDA, o que mostra que a capacidade antioxidante cerebral é bastante efetiva.

Estes achados em relação aos níveis elevados de MDA são consistentes com os de Narsaria *et al.* (2011) que observaram que os níveis elevados de MDA estão envolvidos no estresse oxidativo e na patogênese da malária grave, como a malária cerebral. Além disso, Baptista *et al.* (2010) acreditam que o sequestro de células CD8+, somado a presença das hemácias parasitadas nos vasos cerebrais contribuem significativamente para o desenvolvimento de malária cerebral em ratos C57BL/6. Nossos dados também corroboram com Reis *et al.* (2010) que observaram níveis elevados de ROS, relacionados às lesões neurológicas na malária cerebral, e aumento nas concentrações de MDA no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA, indicando alto estresse oxidativo.

Por outro lado, nos grupos de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* e N-acetilcisteína, o comportamento foi semelhante entre si durante a infecção, exceto no 3º e no 5º dias de estudo (Fig.32), em que houve uma diminuição significativa nos níveis de MDA nos animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ; tab.12, respectivamente), sugerindo que ele possa ser sensivelmente efetivo na tentativa de diminuir as lesões oxidativas relacionadas a peroxidação lipídica, mesmo com dificuldades em transpor a BHE, ao passo que NAC não foi eficiente em diminuir as lesões oxidativas. Assim, em todos os grupos de animais infectados e suplementados com antioxidantes, os níveis de MDA foram elevados, mas não houve um aumento significativo do 1º para o 10º dia de infecção ( $p = 0,5442$  e  $p = 0,8092$  para N-acetilcisteína e *Agaricus sylvaticus* respectivamente; tab. 12), o que foi acompanhado pelos níveis de TEAC, sugerindo que a nível cerebral, uma vez que ocorre estresse oxidativo, há mobilização da defesa antioxidante para tentar restabelecer o equilíbrio redox e debelar a infecção.

De fato, Das *et al.* (1991) avaliaram a peroxidação lipídica no LCR de pacientes com malária cerebral e encontraram níveis elevados de MDA em relação aos controles, sugerindo que MDA esteja aumentado em decorrência da infecção. Do mesmo modo, Pabón *et al.* (2003) encontraram níveis aumentados de MDA em em pacientes com malária não-complicada e diminuição da capacidade antioxidante total, mostrando que existe alto nível de estresse oxidativo mediado pelo MDA. Além disso, a infecção malárica resultou em diminuição dos níveis das enzimas antioxidantes, como catalase, GSH, e SOD, além de albumina, ascorbato e tocoferol plasmático. Estes estudos corroboram com nossos achados e reforçam a sugestão do envolvimento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica na malária cerebral.

Somando-se a isso, Jambou *et al.* (2010) analisaram a interação de células endoteliais de microvasos cerebrais humanos co-cultivadas com hemácias infectadas e demonstraram que a transferência de material das hemácias infectadas para a membrana plasmática das células endoteliais cerebrais ocorre em um processo semelhante a trogocitose, seguindo pelo aumento na produção de TNF- $\alpha$ , estando relacionados com a abertura das junções intercelulares. Além disso, a transferência de antígenos pode transformar as células endoteliais em um marcador para a resposta imune e contribuir para profundas alterações nas células endoteliais cerebrais, levando ao edema e malária cerebral.

Em relação ao NO cerebral, os resultados mostraram que não houve significância estatística entre os animais dos grupos controles positivo em relação ao controle negativo, apresentando valores de NO bastante parecidos durante todo o período de estudo (Fig. 33), o que sugere que o NO não esteja envolvido no estresse oxidativo cerebral gerado durante a infecção ou que possa existir outra molécula, como o ONOO<sup>-</sup>, gerado a partir do NO, que, de acordo com Savvides *et al.* (2002) pode atuar inibindo a enzima glutathione redutase e exacerbar as complicações da CM. Desse modo, o aumento da parasitemia não estaria relacionado diretamente a produção de NO. Estes dados corroboram com vários estudos sobre malária cerebral (Jung *et al.*, 2006; Yeo *et al.*, 2007; Moreira, 2010).

Por outro lado, Gramaglia *et al.* (2006) defende a idéia de que a malária cerebral possa estar associada a baixas concentrações de NO. Ao mesmo tempo, Favre *et al.* (1999), investigaram o curso da infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA no estágio sanguíneo da malária em ratos deficientes de iNOS para verificar se a malária cerebral é dependente da síntese de NO. Os resultados mostraram que não houve diferença na progressão da parasitemia, sobrevivência e valores hematológicos, o que sugeriu que o NO não é um fator crucial para o desenvolvimento da malária cerebral murina.

Nesse sentido, as principais complicações no tecido cerebral devem estar relacionadas ao MDA e/ou à isquemia e a ineficiência de reperfusão pela falta de indução da NOS-1 na infecção. De fato, alguns estudos mostram que suplementação de nitritos e L-arginina podem ser fatores protetores para esse tipo de complicação (Jung *et al.*, 2006; Yeo *et al.*, 2007). Além disso, Dhangadamajhi *et al.* (2009) observaram que variações genéticas na NOS-3 em pacientes com malária branda podem aumentar sua expressão e aumentar a produção de NO, o que levaria a proteção contra a malária cerebral.

Isto é consistente com o fato de que nos grupos de animais suplementados com N-acetilcisteína ocorreu um aumento nos níveis de NO em relação aos controles positivos e negativos durante todo o período de estudo ( $p < 0,01$ ) e também em relação ao grupo *Agaricus sylvaticus* no 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias de infecção ( $p < 0,01$ ), o que mostra que a suplementação NAC pode estar relacionada a indução da síntese de NO no tecido cerebral, estimulando a defesa pró-oxidante para debelar infecção, mas a defesa antioxidante endógena pode ter sido

mobilizada para diminuir as concentrações de NO induzido por NAC, uma vez que não houve aumento significativo do 1º para o 10º dia de estudo ( $p=0,9520$ ; Tab.13), como tem sido proposto por John *et al.* (2010). Do mesmo modo, Al-Yaman *et al.* (1998) encontraram níveis significativamente elevados de NO sérico de crianças com malária cerebral na Papua Nova Guiné, se comparado com aqueles que não tiveram tal complicação, o que sugeriu que NO em altas concentrações pode estar envolvido nas complicações da malária cerebral.

Somando-se a isso, Cabrales *et al.* (2011), em estudo recente, com camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, observaram que a patogênese da malária cerebral está associada com a baixa biodisponibilidade do NO e complicações microcirculatórias cerebrais, com uma acentuada diminuição no fluxo sanguíneo cerebral, vasoconstrição, obstrução vascular pela aderência celular e hemorragias. Além disso, demonstraram que a suplementação de NO previne a vasoconstrição e melhora o fluxo sanguíneo, especialmente na resposta ao tratamento pelas arteríolas e vênulas de pequeno calibre. Assim, o NO exógeno forneceu proteção contra as hemorragias cerebrais e inflamação, estando relacionado a proteção contra a malária cerebral e melhora na hemodinâmica microvascular. Paralelamente, Hawkes *et al.* (2011), acreditam que a suplementação de NO inalado poderá melhorar o estado de crianças com malária grave submetidas a terapia antimalárica e que a ativação endotelial desempenha um papel crucial na patogênese da malária grave, em que a angiopoietina-2 (Ang-2) tem sido descrita recentemente como um regulador chave. O NO é o maior inibidor de Ang-2 liberada do endotélio, diminui a inflamação endotelial e reduz a adesão de hemácias parasitadas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Yeo *et al.* (2008), que exploraram a relação entre a bioatividade de Ang-2, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), perfusão tissular e dados clínicos em malária grave. Os resultados mostraram que as concentrações de Ang-2 foram elevadas na malária grave e associadas a concentrações de ICAM-1, aumento de lactato venoso, carga parasitária e mortalidade, por outro lado, VEGF foi inversamente relacionado com estes marcadores. A recuperação da função endotelial foi relacionada com a redução nas concentrações de Ang-2. Ao mesmo tempo, a Ang-2, liberada das células endoteliais com reduzida bioatividade de NO, provavelmente contribui para

a ativação endotelial, sequestro do parasita nos vasos e perfusão prejudicada. Assim, agentes que melhorem o NO endotelial e/ ou antagonizem Ang-2 podem ter papéis terapêuticos na malária grave.

Os efeitos da suplementação com NAC na infecção malárica devem ser avaliados com cautela, pois Arreesrisom *et al.* (2007) observaram que a atividade antioxidante de NAC pode inibir a ação anti-malárica de algumas drogas, como a artemisina, que tem seu mecanismo de ação antiparasitária através do estresse oxidativo. Assim, a administração de drogas antagonistas pode levar a efeitos adversos nos pacientes tratados. Resultados semelhantes foram encontrados por Charunwatthana *et al.* (2009) em relação ao artesunato.

Em contrapartida, o grupo *Agaricus sylvaticus* apresentou níveis significativamente elevados de NO ao 1° ( $p < 0,05$ ) e 3° ( $p < 0,01$ ) dias de infecção, se comparado ao controle positivo, mas a partir do 5° dia de infecção não apresenta diferença significativa. Além disso, os níveis de NO diminuem significativamente do 1° ao 10° dia de estudo ( $p = 0,0043$ ; Tab.13), o que reforça a ideia de que *Agaricus sylvaticus* inibe a síntese de NO cerebral e que o NO não estaria envolvido na patogenia da malária cerebral. Esta síntese inicial de NO pode ser estimulada pela presença do parasita, mas inibida pelo *Agaricus sylvaticus*. Além disso, Kaiser *et al.* (2006) avaliaram os efeitos da EPO na sobrevida de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e demonstraram que a inoculação de EPO humana recombinante no início das manifestações clínicas da malária cerebral protege os animais da morte. Além disso, ocorreu inibição da expressão de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  pela EPO e os animais tratados apresentaram poucas hemorragias cerebrais.

Portanto, torna-se bastante intrigante a investigação dos fenômenos envolvidos na fisiopatogenia da doença, especialmente na malária cerebral. De um lado a manutenção do estresse oxidativo parece necessária, resultando em uma indução da capacidade antioxidante, essencial para evitar o dano endotelial e as agressões a BHE, no entanto, o estresse oxidativo como via de defesa pode causar a morte do hospedeiro, por falta de oxigenação no cérebro e aumentando a gravidade da doença devido a uma resposta citotóxica ineficiente. Por outro lado, a indução da produção de NO pode auxiliar na reperfusão do vaso isquêmico e na destruição do parasita, mas em altas doses pode promover a formação de ONOO<sup>-</sup> que pode lesionar o endotélio e levar ao edema cerebral.

### 6.2.1- Correlação Cerebral e a Suplementação com Antioxidantes

No estudo de correlação entre MDA e TEAC cerebrais, os resultados mostraram a ocorrência de correlação positiva moderada e altamente significativa nos grupos controle positivo ( $r=0,5300$  e  $p=0,0007$ ; Fig. 34b), no grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína ( $r=0,5328$  e  $p=0,0004$ ; Fig.34d) e no grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* ( $r=0,4205$  e  $p=0,0076$ ; Fig. 34e). Estes dados sugerem que a medida que aumenta a concentração de MDA cerebral, como resultado do estresse oxidativo, aumenta a capacidade antioxidante total, na tentativa de diminuir essas lesões e restabelecer o equilíbrio redox durante a infecção pelo *P. berghei*. Este comportamento entre MDA e TEAC cerebral é semelhante ao encontrado no pulmão, mostrando que a peroxidação lipídica realmente está envolvida nas complicações da malária cerebral.

Paralelamente, os resultados do estudo de correlação entre MDA e NO cerebral mostraram que no grupo controle negativo (Fig. 36c), houve uma correlação positiva moderada e altamente significativa ( $r=0,5281$  e  $p=0,0002$ ) entre os parâmetros, o que não foi encontrado no grupo controle positivo (Fig. 36b). Portanto, é provável que em condições normais, o aumento das concentrações de MDA esteja relacionado ao aumento dos níveis de NO e não quando ocorre infecção. No grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* (Fig. 36e), há uma tendência de significância estatística ( $p=0,0581$ ) entre MDA e NO, como provável indução inicial de NO provocada pela presença do parasita, uma vez que NO tende a diminuir ao longo do tempo (do 1º ao 10º dia;  $p=0,0043$ ; tab.13) .

A correlação entre TEAC e NO cerebral mostrou que no grupo controle negativo (Fig. 38c), há uma correlação positiva moderada e altamente significativa ( $r=0,3863$  e  $p=0,0087$ ) entre os parâmetros, o que não foi encontrado no grupo controle positivo (Fig. 38b). Portanto, é provável que em condições normais, o NO seja produzido paralelamente às concentrações de TEAC. Assim, NO não estaria relacionado a malária cerebral. Além disso, não houve significância estatística de TEAC com NO nos grupos de animais suplementados N-acetilcisteína (Fig. 38d) e *Agaricus sylvaticus* (Fig. 38e), o que sugere ser o MDA relacionado a estimulação da resposta antioxidante.

No estudo de correlação entre parasitemia e MDA cerebral, houve correlação negativa moderada e significativa entre os parâmetros apenas no grupo controle positivo ( $r=-0,3647$  e  $p=0,0287$ ; Fig. 40b), o que pode sugerir que, uma vez que a parasitemia aumentou com a evolução da doença, ocorre uma diminuição dos níveis de MDA, dada a capacidade antioxidante cerebral mais efetiva.

O estudo da correlação entre parasitemia e TEAC cerebral, mostrou que no grupo controle positivo (Fig. 42b), há uma correlação negativa moderada e altamente significativa ( $r=-0,4956$  e  $p=0,0011$ ) entre os parâmetros. Assim, provavelmente ocorre uma diminuição da capacidade antioxidante cerebral, à medida que a parasitemia progride, mas isto deve estar relacionado ao fato de que o cérebro pode ter uma defesa antioxidante bastante eficiente, não permitindo um aumento progressivo nos níveis de MDA durante o período de estudo. Do mesmo modo, no grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína (Fig. 42c), houve uma correlação negativa moderada e significativa ( $r=-0,3327$  e  $p=0,0313$ ) entre parasitemia e TEAC, mostrando que, mesmo que os animais sejam suplementados com NAC ocorre uma diminuição de TEAC com a evolução da Parasitemia, o que mostra que NAC também não permitiu um aumento progressivo nos níveis de MDA.

A correlação entre parasitemia e NO cerebral, mostrou que apenas no grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* (Fig. 44d), houve uma correlação negativa moderada e altamente significativa ( $r=-0,4578$  e  $p=0,0044$ ). Portanto, estes dados reforçam que o *Agaricus sylvaticus* esteja relacionada a inibição da síntese ou varredura de NO com a evolução da doença, atuando através de um mecanismo antioxidante pouco eficiente, no entanto, sensivelmente melhor do que NAC. Por outro lado, no grupo de animais suplementados com NAC (Fig. 44c), não houve significância estatística ( $p=0,0519$ ) entre os parâmetros estudados, mas é provável que ela esteja associada a indução da expressão e síntese de NO cerebral ( $r=0,3056$ ), pois nos grupos de animais tratados com NAC apresentaram níveis elevados de NO cerebral, se comparado ao controle positivo, apesar de não ter havido um aumento de NO do início ao final do estudo ( $p=0,9520$ ; Fig.44c).

### 6.3- ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS COMPORTAMENTOS OXIDATIVOS PULMONAR E CEREBRAL

No tecido pulmonar, o grupo controle positivo apresentou uma capacidade antioxidante com níveis pequenos de TEAC, mas aumentou ao longo do período de estudo, equivalendo-se estatisticamente ao tecido cerebral (Fig. 46) no 10º dia de infecção ( $p=0,1562$ ; tabela 20). No cérebro, TEAC apresentou níveis elevados desde o início da infecção e significativamente maior do que TEAC pulmonar do 1º ao 10º dias de infecção. Isso mostra que capacidade antioxidante cerebral pode ser mais efetiva do que a pulmonar no combate a infecção, como observado pelos níveis de MDA. Paralelamente, em condições normais (Fig. 47), o tecido cerebral apresentou uma capacidade antioxidante superior à pulmonar durante todo o período de estudo ( $p<0,01$  do 1º ao 7º dias e  $P<0,05$  no 10º dia; tab. 2 1).

No grupo de animais suplementados com N-acetilcisteína (Fig. 48), a capacidade antioxidante pulmonar também mostrou-se pequena no início da infecção e aumentou com a evolução da doença durante todo o período de estudo, mas no 7º atingiu valores semelhantes aos do TEAC cerebral ( $p>0,05$ ; tabela 22). No tecido cerebral, NAC parece não ser muito efetiva para aumentar a capacidade antioxidante, mas apresentou níveis elevados de TEAC durante todo o período de estudo. Paralelamente, no grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* (Fig. 49) no tecido pulmonar, TEAC mostrou-se elevado no início da infecção e aumenta progressivamente de maneira significativa durante todo o período de estudo ( $p<0,05$ ; tabela 23). Por outro lado, no cérebro, apesar de TEAC ter apresentado níveis elevados no início da infecção, isto não se refletiu em aumento da capacidade antioxidante, sugerindo que os componentes do *Agaricus sylvaticus* e a NAC tem dificuldades em ultrapassar a BHE e exercer seus efeitos.

Em relação ao MDA pulmonar do controle positivo (Fig. 50), os valores foram significativamente maiores do que no cérebro ( $p<0,05$ ) do 5º ao 10º dias de infecção para o mesmo período, o que pode sugerir que as lesões oxidativas são maiores no tecido pulmonar e relacionadas a peroxidação lipídica. Por outro lado, em condições normais (Fig. 51) as concentrações de MDA no tecido cerebral são significativamente maiores do que no pulmão ( $p<0,01$ ) no 5º 7º e 10º dias de infecção (tabela 25). Além disso, no cérebro não houve aumento significativo

( $p=0,8477$ ; Tab. 12) nos níveis de MDA do início ao final da infecção, como ocorreu no pulmão ( $p=0,0002$ ; Tab.3). Isso mostra que as lesões oxidativas são maiores no pulmão do que no cérebro e que a defesa antioxidante cerebral seja mais efetiva do que a pulmonar. Portanto, o estresse oxidativo parece decorrer do aumento nas taxas de MDA e não da diminuição da defesa antioxidante, reforçando a sugestão de que o estresse oxidativo mediado pelo  $\text{OH}^\bullet$  seja um mecanismo importante para a malária grave. Estes achados corroboram com Moreira (2010), que encontrou valores elevados de MDA pulmonar, quando comparado ao cerebral, sugerindo que o MDA esteve relacionado às complicações da malária pulmonar em um modelo da doença causada pelo *P. berghei*.

De fato, marcadores do estresse oxidativo em ratos e humanos parasitados encontram-se em níveis aumentados em comparação a controles não infectados (SOHAIL *et al.*, 2007). Somando-se a isso, pode haver co-infecção bacteriana frequentemente presente em pacientes com síndrome da angústia respiratória, agravando o quadro clínico (TAYLOR *et al.*, 2006; MOHAN *et al.* 2008). Adicionalmente, Araújo *et al.* (2008) avaliaram o envolvimento do estresse oxidativo na trombocitopenia em pacientes infectados pelo *P. vivax* e demonstraram níveis elevados de MDA, além de GSH-Px, indicando que o MDA é um marcador do estresse oxidativo e associado à trombocitopenia de pacientes com malária *vivax*.

No grupo de animais suplementados com NAC no tecido pulmonar (Fig. 52) as lesões oxidativas aumentaram progressivamente a partir do 3º dia de infecção ( $p<0,01$ ; tab. 26), e foram maiores do que no cérebro no 5º, 7º e 10º dias de infecção, enquanto que no cérebro, MDA foi maior no 3º dia de infecção. Do mesmo modo, no grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* (Fig. 53) no tecido pulmonar, o MDA foi significativamente maior no 5º e no 7º dias de infecção ( $p<0,01$ ; tab.27). Portanto, em ambos os grupos de animais suplementados, os valores de MDA cerebral não aumentaram progressivamente com a evolução da doença, sendo que nos grupos de animais tratados com *Agaricus sylvaticus* o MDA cerebral e pulmonar diminuiu sensivelmente, enquanto que NAC foi ineficiente em diminuir o MDA em ambos os tecidos, mas, curiosamente, diminuiu a parasitemia a longo prazo e isso deve ser explorado em estudos posteriores. Portanto, o *Agaricus sylvaticus* pode diminuir as lesões oxidativas cerebrais relacionadas a peroxidação lipídica, mesmo que tenha dificuldades em atravessar a BHE.

Em relação ao NO pulmonar no controle positivo (Fig. 54), os valores foram significativamente maiores do que no cérebro ( $p < 0,05$ ) em todo o período de estudo, o que pode sugerir que no pulmão o NO pode estar relacionado ao mecanismo de defesa pró-oxidante. De fato, em condições normais (Fig. 55) as concentrações de NO pulmonar são menores em relação ao controle positivo, especialmente do 5° ao 10° dias de infecção, no entanto, no tecido cerebral, o NO não variou, se comparado ao controle positivo durante todo o período de estudo e não houve diferenças na concentração de NO no 3° e no 5° dias de infecção ( $P < 0,05$ ; tabela 29) no controle negativo entre os dois tecidos. Isto reforça a idéia de que o NO não esteja relacionado diretamente a patogenia da malária cerebral, mas pode estar associado a defesa pró-oxidante no tecido pulmonar.

O grupo de animais suplementados com NAC (Fig. 56) mostrou que ocorreu um aumento nos níveis de NO com a evolução da doença apenas no tecido pulmonar e que as concentrações de NO pulmonar foram maiores do 3° ao 10° dia de infecção (tabela 30) se comparado ao NO cerebral. Além disso, NO cerebral não aumentou progressivamente durante a infecção, mas esteve em níveis elevados neste grupo, o que evidencia que NAC induz a síntese de NO em ambos os tecidos. Por outro lado, no grupo de animais suplementados com *Agaricus sylvaticus* (Fig. 57), os resultados mostraram que não houve aumento nos níveis de NO nos tecidos pulmonar e cerebral. Adicionalmente, no pulmão, os níveis de NO foram significativamente menores que no cérebro no 7° e no 10° dias de infecção ( $p < 0,01$ ; tabela 31). Isto sugere que *Agaricus sylvaticus* esteja relacionado à inibição da síntese ou varrendo NO para debelar a infecção através de um mecanismo antioxidante relativamente mais eficaz que NAC a nível pulmonar e cerebral.

Desse modo, é importante ressaltar que o *Plasmodium* é dependente de um ambiente com equilíbrio redox para se desenvolver (KEHR *et al.*, 2010), portanto, qualquer alteração neste equilíbrio, neste caso, em função da administração de NAC e *Agaricus sylvaticus*, pode interferir no desenvolvimento do parasita. Isto pode ocorrer por dois mecanismos diferentes para impedir o desenvolvimento do parasita. Assim, estudos adicionais são necessários para tentar compreender os mecanismos pelos quais NAC e *Agaricus sylvaticus* exercem seus efeitos, no entanto, são importantes ferramentas para novas terapias adjuvantes na malária, especialmente nos casos graves, tais como a malária pulmonar e cerebral.

#### 6.4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou que apesar da complexidade do envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatogenia da malária e dos efeitos da suplementação com antioxidantes na evolução da doença, parece ser evidente que ocorre estresse oxidativo mediado pelo MDA cerebral e pulmonar neste modelo de estudo e que os suplementos antioxidantes estudados interferem positivamente na evolução da doença e podem ser medidas terapêuticas úteis na infecção pelo *Plasmodium*.

Posteriormente, outros estudos são necessários para tentar compreender melhor os fenômenos fisiopatológicos na malária grave e estabelecer medidas de controle da doença, tais como:

- Avaliação do perfil do ácido úrico nas amostras cerebrais e pulmonares, para tentar compreender em que momento se iniciam os acessos de isquemia e reperfusão;
- Estudar o efeito da inibição da iNOS nos acometimentos cerebrais e pulmonares dos camundongos infectados com o *P. berghei*;
- Avaliar a expressão de peroxinitrito e sua relação com a malária grave;
- Avaliar os efeitos da suplementação de *Agaricus sylvaticus* e NAC em indivíduos infectados e submetidos ao tratamento antimalárico;
- Estudar a relação entre a existência de polimorfismos na NOS-1 e a síntese de óxido nítrico em amostras cerebrais;
- Avaliar a expressão de citocinas, tais como GM-CSF, e suas correlações com a capacidade antioxidante e com o NO na evolução da malária;
- Estimar os efeitos da suplementação prévia de *Agaricus sylvaticus* com pelo menos 5 dias antes da infecção sobre a evolução da parasitemia e gravidade da doença nos tecidos cerebral e pulmonar e na sobrevivência dos animais;
- Estimar os efeitos da intervenção terapêutica de guanilato ciclase na expressão da iNOS na malária pulmonar;
- Estudar a intervenção com Eritropoietina para avaliar a sobrevivência de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA na tentativa de prevenir as complicações da malária cerebral.

## 7- CONCLUSÕES

Neste modelo experimental de malária induzida pelo *P. berghei* ANKA, podemos concluir que:

- A Parasitemia aumentou progressivamente com a evolução da doença, exceto do 7° ao 10° dia de infecção nos animais suplementados com antioxidantes;
- *Agaricus sylvaticus* e N-acetilcisteína apresentaram comportamento semelhante sobre os marcadores do estresse oxidativo e da defesa antioxidante nos tecidos cerebral e pulmonar, mas *Agaricus sylvaticus* diminuiu sensivelmente as lesões oxidativas;
- A capacidade antioxidante total foi maior quando administrados os antioxidantes, sendo que o *Agaricus sylvaticus* teve efeito mais pronunciado no pulmão e NAC sensivelmente melhor no cérebro;
- *Agaricus sylvaticus* e N-acetilcisteína possivelmente atuam por dois mecanismos distintos para tentar debelar a infecção, mas o *Agaricus sylvaticus* foi efetivo na prevenção da peroxidação lipídica cerebral e pulmonar;
- N-acetilcisteína induziu a síntese de NO pulmonar e de forma menos intensa no tecido cerebral, enquanto que o *Agaricus sylvaticus* inibiu a síntese de NO pulmonar e cerebral;
- As lesões oxidativas foram mais pronunciadas no tecido pulmonar do que no cerebral e relacionadas a peroxidação lipídica, dado as concentrações de MDA;
- A administração dos antioxidantes diminuiu a parasitemia em longo prazo;
- A defesa antioxidante cerebral parece ser mais efetiva do que a pulmonar, apresentando níveis elevados de TEAC e impedindo um aumento progressivo nos níveis de MDA;
- O NO não foi relacionado a patogenia da malária cerebral e pulmonar;

## 8– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agbor-Enoh, S.; Seudieu, C.; Davidson, E.; Dritschilo, A.; Jung, M. Novel Inhibitor of *Plasmodium* Histone Deacetylase That Cures *P. berghei*-Infected Mice, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5):1727–1734, 2009.

Akide-Ndunge, O.B.; Tambini, E.; Giribaldi, G.; McMillan, P.j.; Müller, S.; Arese, P.; Turrini, F. Co-ordinated stage-dependent enhancement of *Plasmodium falciparum* antioxidant enzymes and heat shock protein expression in parasites growing in oxidatively stressed or G6PD-deficient red blood cells. *Malaria Journal*, 8(113): 1-15, 2009.

Al-Yaman, F.M.; Genton, B.; Clark I. A. The ratio of reactive nitrogen intermediates to tumour necrosis factor and clinical outcome of falciparum malaria disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 92(4):417-20, 1998.

Alves, F.P.; Durlacher, R.R.; Menezes, M.J.; Krieger, H.; Silva, L.H.; Camargo, E.P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:641–648, 2002.

Anstey, N.M.; Handojo, T.H.; Pain, M.C.; Kenangalem, E.; Tjitra, E.; Price, R.N.; Maguire, G.P. Lung Injury in Vivax Malaria: Pathophysiological Evidence for Pulmonary Vascular Sequestration and Posttreatment Alveolar-Capillary Inflammation. *The Journal of Infectious Diseases*, 195:589–596, 2007.

Atamna, H.; Ginsburg, H. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*, *Mol Biochem Parasitol*, 63(2):312, 1994.

Araújo, C.F.; Lacerda, M.V.; Abdalla, D.S.; Lima, E.S. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 103(6): 517-521, 2008.

Arreesrisom, P.; Dondorp, A.M.; Looareesuwan, S.; Udomsangpetch, R. Suppressive effects of the anti-oxidant *N*-acetylcysteine on the anti-malarial activity of artesunate. *Parasitology International*. 56(3): 221-226, 2007.

Ayres, M.; Ayres Junior, M.; Ayres, D. L.; Santos, A. S. *Bioestat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá-IDSM/ MCT/ CNPq, Belém-PA, BRASIL, 2007.

Barbisan, L.F.; Miyamoto, M.; Scolastici, C.; Salvadori, D.M.; Ribeiro, L.R.; Eira, A.F. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on a rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *J Ethnopharmacol*, 83:25–32, 2002.

Barros, L.; Falcão, S.; Baptista, P.; Freire, C.; Vilas-Boas, M.; Ferreira, I. Antioxidant activity of *Agaricus sp.* mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*. 111(1): 61-66, 2008.

Baptista, F.G. Pamplona, A.; Pena, A.C; Mota, M.M.; Pied, S.; Vigário, A.M. Accumulation of *Plasmodium berghei*-Infected Red Blood Cells in the Brain Is Crucial for the Development of Cerebral Malaria in Mice. *Infection and Immunity*, 78(9):4033–4039, 2010.

Baton, L.A.; Ranford-Cartwright, L. How do malaria ookinetes cross the mosquito midgut wall? *Trends Parasitol*. 21:22–28,2005.

Becker, k.; Tilley, L.; Vennerstrom, J.; Roberts, D.; Rogerson, S.; Ginsburg, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol*, 34(2): 163-189, 2004.

Boulos, M.; Costa, J.; Tosta, C. Comprometimento Pulmonar na Malária (Revisão). *Rev.Inst.Med. Trop. São Paulo*, 35(1):93-102, 1993.

Bozdech, Z.; Ginsburg, H. Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum* – data mining of the transcriptome. *Malaria Journal*, (3)23:1-10, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saude (SVS). Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica. **Pacto Pela Saude**, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Vigilância em Saúde (SVS). **Programa Nacional de Controle e Prevenção da Malária – PNCM**, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saude (SVS). Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica - módulo malária (Sivep-Malaria). **Situação Epidemiológica da malária no Brasil**, 2009.

Brunet, L.R. Nitric Oxide in Parasitic Infections. *Int Immuno pharmacol*.1(8):1457-1467, 2001

Cabrales, P.; Zanini G.M.; Meays D.; Frangos J.A.; Carvalho L.J. Nitric Oxide Protection Against Murine Cerebral Malaria Is Associated With Improved Cerebral Microcirculatory Physiology. *J Infect Dis*. 203 (10): 1454-1463, 2011.

Cande, C.; Cecconi, F.; Dessen, P.; Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspaseindependent pathways of cell death? *J. Cell Sci*. 115, 4727–4734, 2002.

Carballeira, N.M. New Advances in Fatty Acids as Antimalarial, Antimycobacterial and Antifungal Agents. *Prog Lipid Res*. 47(1): 50–61, 2008.

Casals-Pascual, C.; Idro, R.; Gicheru, N.; Kitsao, B.; Gitau, E.; Mwakesi, R.; Newton, C. High levels of erythropoietin are associated with protection against neurological sequelae in African children with cerebral malaria. *PNAS*, 105(7):2634–2639, 2008.

Caulfield, L.E.; Richard, S.A.; Black, R.E. Undernutrition As An Underlying Cause Of Malaria Morbidity And Mortality In Children Less Than Five Years Old. *Am J Trop Med Hyg*, 71(2): 55–63, 2004.

Charunwatthana, P.; Faiz, M.A.; Ruangveerayut, R.; Maude, R.; Rahman, M.R.; Roberts, L.J.; Hasan, M.U.; Newton, N.; White, N.J.; Day, N.P.; Dondorp, A.M. N-Acetylcysteine as adjunctive treatment in severe malaria: A randomized double blinded placebo controlled clinical trial. *Crit Care Med.*, 37(2): 516–522, 2009.

Chen, Q.; Schlichtherle, M.; Wahlgren, M. Molecular Aspects of Severe Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(3): 439–450, 2000.

Christofidou-Solomidou, M.; Scherpereel, A.; Wiewrodt, R.; Ng, K.; Sweitzer, T.; Arguiri, E.; Shuvaev, V.; Solomides, C.C.; Albelda, S.M.; Muzykantov, V.R. PECAM-directed delivery of catalase to endothelium protects against pulmonary vascular oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 258:283-292, 2003.

Cunnington, A.J.; Kendrick, S.W.; Wamola, B.; Lowe, B.; Newton, C.R. Carboxyhemoglobin Levels in Kenyan Children With *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71(1):43–47, 2004.

Clark, I.A.; Chaudhri, G.; Cowden, W.B. Some roles of free radicals in malaria. *Free Radic Biol Med*, 6(3): 315-321, 1989.

Clark, I.A.; Alleva, L.M; Mills, A.C.; Cowden, W. B. Pathogenesis of Malaria and Clinically Similar Conditions. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17(3): 509–539, 2004.

Cooke, B.M.; Wahlgren, M; Coppel, R.L. *Falciparum malaria*: sticking up, standing out and out-standing. *Parasitol Today*, 16:416-20, 2000.

Couper, K.N.; Blount, D.G.; Hafalla, J.C.; Nico v.R.; J. Souza, B. Riley, E.M. Macrophage-Mediated but Gamma Interferon-Independent Innate Immune Responses Control the Primary Wave of *Plasmodium yoelii* Parasitemia, *Infection and Immunity*, 75(12):5806–5818, 2007.

Cox-Singh, J.; Davis, T.M.; Ratnam, S.; Rahman, H.A.; Conway, D.J. Singh, B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical. Infectious Diseases*, 46: 165–171, 2008.

Cox-Singh, J.; Singh B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? Trends in Parasitology, 24: 406–410, 2008.

Das, B.S.; Nanda, N.K. Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute *falciparum* malaria. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 93(1):58-62,1999.

Das, B.S.; Mohanty, S.; Mishra, S.K.; Patnaik, J.K.; Satpathy, S.K.; Mohanty, D. Bose, T.K. Increased cerebrospinal fluid protein and lipid peroxidation products in patients with cerebral malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg,85:733–4, 1991.

Dawson A.H.; Henry, D.A.; McEwen, J: Adverse reactions to N-acetylcysteine during treatment for paracetamol poisoning. Med J Aust. 150(6):329-31, 1989.

Day, N.; Dondorp, A. M. The Management of Patients With Severe Malaria. Am J Trop Med Hyg, 77(6): 29-35, 2007.

De Jong, R.J.; Miller, L.M.; Molina-Cruz, A.; Gupta, L.; Kumar, S.; Barillas-Mury, C. Reactive Oxygen Species Detoxification By Catalase Is A Major Determinant Of Fecundity In The Mosquito Anopheles Gambiae. Pnas, 104(7):2121–2126, 2007.

De Walick, S.; Amante, F.H.; McSweeney, K.A.; Randall, L.M.; Stanley, A.C.; Haque, A.; Kuns, K.D.; MacDonald, K.P.A.; Hill, G.R.; Engwerda, C.R. Cutting Edge: Conventional Dendritic Cells Are the Critical APC Required for the Induction of Experimental Cerebral Malaria. 178:6033-6037, 2007.

Dekhuijzen, P.N.R. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J., 23: 629–636, 2004.

Del Maestro, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. Acta Physiol Scand; 492:153-168, 1980.

Dey, S.; Guha, M.; Alam, A.; Goyal, M.; Bindu, S.; Pal, C.; Maity, P.; Bandyopadhyay, U. Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidative stress to promote hepatocyte apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 46(2):271-281, 2009.

Dhangadamajhi, G.; Mohapatra, B.N.; Kar, S.K.; Ranjit M. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and *Plasmodium falciparum* Infection in Indian Adults. *Infection and Immunity*, 77(7): 2943–2947, 2009.

Dimmeler, S.; Haendeler, J.; Nehls, M.; Zeiher, A.M. Suppression of Apoptosis by Nitric Oxide via Inhibition of Interleukin-1 $\beta$ -converting Enzyme (ICE)-like and Cysteine Protease Protein (CPP)-32-like Proteases, *JEM* 185(4):4 601-608, 1997.

Dumaswala, U.J.; Zhuo, L.; Mahajan, S.; Nair, P.N.; Shertzer, H.G.; Dibello, P.; Jacobsen, D.W. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J Physiol* 208: C867-C873, 2001.

Dusse, LM.; Vieira, L.M.; Carvalho, M.G. Revisao sobre oxido nitrico. *J Bras Patol Med Lab* 39(4): 343-350, 2003.

Epiphanio, S.; Campos, M.; Pamplona, A.; Carapau, D.; Pena, A.C.; Ataíde, R.; Monteiro, C.A. Félix, N.; Marinho, C.R.; Dias, S.; Mota, M. VEGF Promotes Malaria-Associated Acute Lung Injury in Mice. *PLoS*, 6: (5), 1-10, 2010.

Erel, O.; Kocyigit, A.; Anci, S.; Aktepe, N.; Bulut, V. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. *Clin Biochem* 30(8): 631-639, 1997.

Erel, O.; Vural, H.; Aksoy, N.; Aslan, G.; Ulukanligil, M. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. *Clin Biochem* 34: 341-344, 2001.

FAVRE, N.; RYFFEL, B.; RUDIN, W. The development of murine cerebral malaria does not require nitric oxide production. *Parasitology*, 118: 135-138, 1999.

Felippe Jr., J.; Percario, S. Prevenção de aterosclerose experimental com o uso de antioxidantes: papel das vitaminas e do beta caroteno. *Rev Soc Bras Med Biomolec Rad Livres*, 1(3):21-25,1995.

Fernhoff N.B.; Derbyshire E.R.; Marletta M.A. A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *PNAS*, 106(15):21602–21607, 2009.

Ferreira, M.U.; Nunes, M.S; Wunderlich, G. Antigenic Diversity and Immune Evasion by Malaria Parasites. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(6): 987–995, 2004.

Firenzuoli, F.; Gori, L.; Lombardo, G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. *eCAM*, 5(1): 3–15, 2008.

Frevert, U.; Engelmann, S.; Zougbede, S.; Stange, J.; Matuschewski, K.; Liebes, L.; Yee, H. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol*. 3:e192, 2005.

Fritsche, G.; Larcher, C.; Schennach, Harald.; Weiss, G. Regulatory Interactions between Iron and Nitric Oxide Metabolism for Immune Defense against *Plasmodium falciparum* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*,183:1388–94, 2001.

Gachot, B.; Wolff, M.; Nissack, G.; Veber, B.; Vachon, F. Acute Lung Injury Complicating Imported *Plasmodium falciparum* Malaria, *Chest*,108;746-749, 1995.

Garcia, J.E.; Puentes, A.; Patarroyo, M.E. Developmental Biology of Sporozoite-Host Interactions in *Plasmodium falciparum* Malaria: Implications for Vaccine Design. *Clin Microbiol Rev*, 19(4): 686–707, 2006.

Gennari, J.; Veronesi, R.; Felippe Jr, J.; Gennari M.; Percario, S. Effect of *Agaricus sylvaticus* dietary supplementation on NK cell count in cancer patients. In: Romaine CP, Keil CB, Rinker DL, Royse DJ (eds.). *Science and cultivation of edible and medicinal fungi*. Pennsylvania, Penn State, 633-5, 2004.

Gillman, B.M.; Batchelder, J.; Flaherty, P.; Weidanz, W.P. Suppression of *Plasmodium chabaudi* Parasitemia Is Independent of the Action of Reactive Oxygen Intermediates and/or Nitric Oxide. *Infect And Immunity*, 77(11): 6359–6366, 2004.

Glenister, F.K.; Coppel, R. L.; Cowman, A. F.; Mohandas, N.; Cooke, B.M. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood*, 99(3): 1060-1060, 2002.

Gillrie, M.R.; Krishnegowda, G.; Lee, K.; Buret, A.G.; Robbins, S.M.; Looareesuwan, S.; Gowda, D.C.; Ho, M. Src-family kinase–dependent disruption of endothelial barrier function by *Plasmodium falciparum* merozoite proteins. *Blood*. 110(9):3426-3435, 2007.

Glosli, H.; Tronstad, K.J.; WerGedal, H.; Müller, F.; Svardal, A.; Aukrust, P.; Berge, R.K.; Prydz, H. Human TNF- $\alpha$  in Transgenic Mice Induces Differential Changes in Redox Status and Glutathione-Regulating Enzymes. *The FASEB Journal*, 10: 1096, 2002.

Gobbo, G.M. Atlas of Human Malaria. Disponível em: <[HTTP//www.atlas-malaria.com](http://www.atlas-malaria.com)>. Acesso em: 05 de set. de 2010.

Gramaglia, I.; Sobolewski, P.; Meays, D.; Contreras, R.; Nolan, J.P.; Frangos, J.A.; Intaglietta, M.; Heyde, C.V. Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*, 12(12): 1417-1422, 2006.

Griffiths, M.; Ndungu, F.; Baird, K.; Muller, D.; Marsh K. Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Br J Haematol* 113:486-491, 2001.

Guha, M.; Kumar, S.; Choubey, V.; Maity, P.; Bandyopadhyay U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. *FASEB J*, 20:E439:E449, 2006.

Gutteridge, J.M.; Halliwell, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS*; 15:129-135, 1990.

Halliwell, B; Gutteridge, JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ed. New York: Oxford University Press, 2007.

Hawkes, M.; Opoka, R.O.; Namasopo, S.; Miller, C.; Thorpe, K.E.; Lavery, J.V.; Conroy, A.L.; Liles, W.C; John, C.C.; Kain, K.C. Inhaled Nitric Oxide for the Adjunctive Therapy of Severe Malaria: Protocol for a Randomized Controlled Trial. *Trials*.12(1):176, 2011.

Heinemann, P. Agarici Austroamerici VIII. Agariceae des regions intertropicales d'Amérique du Sud. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.*, 62:365-368, 1993.

Hemmer, C.J.; Lehr, H.A.; Westphal, K.; Unverricht, M.; Kratzius, M.; Reisinger, E.C. *Plasmodium falciparum* Malaria: reduction of endothelial cell apoptosis in vitro. *Infect Immun.*, 73(3): 1764-1770, 2005.

Herbas, M.S.; Okazaki, M.; Terao, E.; Xuan, X.; Arai, H.; Suzuki, H.  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein inhibition is effective in the prevention of cerebral malaria in mice. *Am J Clin Nutr*, 91(1):200-207, 2010.

Hiller, N.; Fritz-Wolf, K.; Deponte, M.; Wende, W.; Zimmermann, H.; Becker, K. *Plasmodium falciparum* glutathione S-transferase—Structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition. *Protein Science*, 15: 281-289 2006.

Hogg, T.; Nagarajan, K.; Herzberg, S.; Chen, L.; Shen, X.; Jiang, H.; Wecke, M.; Blohmke, C.; Hilgenfeld, R.; Schmidt, C. Structural and Functional Characterization of Falcipain-2, a Hemoglobinase from the Malarial Parasite *Plasmodium falciparum* . *J. Biol. Chem.* 281, 25425-25437, 2006.

Huang, S-J; Mau, J-L. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of g-irradiation. *LWT*, 39:707–716, 2006.

Jambou, R.; Combes, V.; Jambou, M-J.; Weksler, B.B.; Couraud, P-O.; Grau, G.E. *Plasmodium falciparum* Adhesion on Human Brain Microvascular Endothelial Cells Involves Transmigration-Like Cup Formation and Induces Opening of Intercellular Junctions. *PLoS Pathogens*, 6(7):1-13, 2010.

Janka, J.J.; Koita, O.A.; Traoré, B.; Traoré, J.M.; Mzayek, F.; Sachdev, V.; Wang, X.; Sanogo, K.; Sangaré, L.; Mendelsohn, L.; Masur, H.; Kato, G.J.; Gladwin M.T.; Krogstad, D.J. Increased Pulmonary Pressures and Myocardial Wall Stress in Children with Severe Malaria. *J Infect Dis*. 202 (5): 791-800, 2010.

Jaramillo, M; Godbout, M; Olivier, M. Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and –independent mechanisms. *J. Immunol.*, 74 (1): 475-84, 2005.

Jaramillo, M; Gowda, D.C.; Radzioch, D.; Oliver, M. Hemozoin Increase IFN- $\gamma$ -Inducible Macrophage Nitric Oxide Generation Through Extracellular Signal-Regulated Kinase- and NF- $\kappa$ B-Dependent Pathways. *J Immunol*, 171:4243-4253, 2003.

Jiang, B.; Haverty, M.; Brecher, P. *N*-Acetyl-L-Cysteine Enhances Interleukin-1 $\beta$ -Induced Nitric Oxide Synthase Expression. *Hypertension*, 34:574-579, 1999.

Jiang, B.; Brecher, P. *N*-Acetyl-L-Cysteine Potentiates Interleukin-1 $\beta$  Induction of Nitric Oxide Synthase: Role of p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinases, *Hypertension*,35:914, 2000.

John C.C.; Kutamba, E.; Mugarura, K.; Opoka, R.O. Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of *Plasmodium falciparum* malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 8(9):997-1008, 2010.

John, C.C.; Panoskaltsis-Mortari, A.; Opoka, R.O.; Park, G.S.; Orchard, P.J.; Jurek, A.M.; Idro, R.; Byarugaba, J.; Boivin, M.J. Cerebrospinal Fluid Cytokine Levels and Cognitive Impairment in Cerebral Malaria. *Am J Trop Med Hyg*.78(2):198-205, 2008.

Jones, A.L. Mechanism of action and value of N-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. *J Toxicol Clin Toxicol.* 36(4):277-85, 1998.

Jung, K.H.; Chu, K.; Ko, S.Y.; Lee, S.T.; Sinn, D.I.; Park, D.K.; Kim, J.M.; Song, E.C.; Kim, M.; Roh, J.K. Early Intravenous Infusion of Sodium Nitrite Protects Brain Against In Vivo Ischemia-Reperfusion Injury. *Stroke.*37:2744-2750, 2006.

Kaiser, K.; Texier, A.; Ferrandiz, J.; Buguet, A.; Meiller, A.; Latour, C.; Peyron, F.; Cespuglio, R.; Picot, S. Recombinant Human Erythropoietin Prevents the Death of Mice during Cerebral Malaria. *The Journal of Infectious Diseases,* 193:987–95, 2006.

Kanzok, S.M.; Schimer, R.H.; Turbachova, I.; Iozef, R.; Becker, K. The Thioredoxin System of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem,* 275(51): 40180-40186, 2000.

Kappe, S. H.; Buscaglia, C. A.; Nussenzweig, V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.,* 20:29–59, 2004.

Kasai, H.; He, L. M.; Kawamura, M.; Yang, P.T. ; Deng, X.W.; Munkanta, M.; Yamashita, A.; Terunuma, H.; Hiramata, M.; Horiuchi, I.; Natori, T.; Koga, T.; Amano, Y.; Yamaguchi, N.; Ito M. IL-12 Production Induced by *Agaricus blazei* Fraction H (ABH) Involves *Toll-like* Receptor (TLR). *eCAM,* 3 (1): 259–267, 2004.

Kaur, A.; Kinihikar, A.G.; Singh, P.P. Bioimmunotherapy of rodent malaria: co-treatment with recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and an enkephalin fragment peptide Tyr-Gly-Gly. *Acta Trop,* 91(1):27-41, 2004.

Kavishe, R.A.; Koenderink, J.B.; McCall, M.B.; Peters, W.H.; Mulder, B.; Hermsen, C.C.; Sauerwein, R.W.; Russel, F.G.; Ven, A.J.. Short Report: Severe *Plasmodium Falciparum* Malaria In Cameroon: Associated With The Glutathione S-Transferase M1 Null Genotype. *Am J Trop Med Hyg,* 75(5): 827–829, 2006.

Kehr, S.; Sturm, N.; Rahlfs, S.; Przyborski, J.; Becker, K. Compartmentation of Redox Metabolism in Malaria Parasites, *PLoS Pathogens*, 6(12):1-12, 2010.

Keller, C.C.; Yamo, O.; Ouma, C.; Ounah, D.; Hittner, J.B.; Vulule, J.M.; Perkins, D.J. Acquisition of Hemozoin by Monocytes Down-Regulates Interleukin-12 p40 (IL-12p40) Transcripts and Circulating IL-12p70 through an IL-10-Dependent Mechanism: In Vivo and In Vitro Findings in Severe Malarial Anemia. *Infect Immun*, 74(9): 5249-5260, 2006.

Khan, S.; Waters, A. Malaria parasite transmission stages: an update. *TRENDS in Parasitology*, 20(2):575-580, 2004.

Kinsella, J.P.; Parker, T.A.; Davis, J.M.; Abman, S.H. Superoxide Dismutase Improves Gas Exchange and Pulmonary Hemodynamics in Premature Lambs. *Am J Respir Crit Care Med*. 172:745-749, 2005.

Kohn, H.I.; Liversedge, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J. Pharmacol Experimen Ther*, 82:292-300, 1944.

Knight, J.A.; Plepe, R.K.; McClellan, L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: Its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem*; 34(12):2433-2438, 1988

Krnajski, Z.; Gilberger, T.W.; Walter, R.D.; Cowman, A.F.; Muller, S. Thioredoxin Reductase Is Essential for the Survival of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages. *Journal of Biolog Chem*, 277(29): 25970–25975, 2002.

Kumar, S.; Das, S.K.; Dey, S.; Maity, P.; Guha, M.; Choubey, V.; Panda, G.; Bondyopadhyay, U. Antiplasmodial Activity of (Aryl)arylsulfanylmethyl]Pyridine. *Antinicrob Agents Chemother*, 52(2):705-715, 2008.

Kuo, Y.C.; Huang, Y.L.; Chen, C.C.; Lin, Y.S.; Chuang, K.A.; Tsai, W.J. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. *J Lab Clin Med*;(140):176–87, 2002.

Lepenieş, B.; Pfeffer, K.; Hurchla, M.A.; Murphy, T.L.; Murphy, M.K.; Oetzel, J.; Fleischer, B.; Jacobs, T. Ligation of B and T Lymphocyte Attenuator reverts the Genesis of Experimental Cerebral Malaria. *J Immunol.* 179:4093-4100, 2007.

Liu, F.; Ooi, V.E.; Chang, S.T. Free radical Scavenging Activities of Mushroom Polysaccharide Extracts. *Life Sci*, 60(10): 761-771, 1997.

Lou, J.; Lucas, R.; Grau, G.E. Pathogenesis of Cerebral Malaria: Recent Experimental Data and Possible Applications for Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(4): 810–820, 2001.

Majano, P.L.; Medina, J.; Zubia, I.; Sunyer, Lourdes.; Lara-Pezzi, E.; Maldonado-Rodriguez, A.; López-Cabrera, M.; Moreno-Otero, R. *N*-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes, *J Hepatol.* 40(4):632-7, 2004.

Mashima, R.; Tilley, L.; Siomos, M.A.; Papalexis, V.; Raftery, M.J.; Stocker, R. *Plasmodium falciparum* Histidine-rich Protein-2 (PfHRP2) Modulates the Redox Activity of Ferri-protoporphyrin IX (FePPIX). *J Biol Chem*, 277(17): 14514–14520, 2002.

Mau, J-L.; Chao, G-R.; Wu, K-T. Antioxidant Properties of Methanolic Extracts from several Ear Mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 5461-5467, 2001.

May, J. M.; Qu, Z.C.; Xia, L.; Cobb, C.E. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279:1946-1954, 2000.

Mendis, K.; Sina, B.J; Marchesini, P.; Carter, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64:97–106, 2001.

Metzger, A.; Mukasa, G.; Shankar, A.H.; Ndeezi, G.; Melikian, G.; Semba, R.D. Antioxidant Status And Acute Malaria In Children In Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg*, 65(2): 115–119, 2001.

Miller, N.; Rice-Evans, C.; Davies, M.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84: 407-412, 1993.

Mizuno, T.K. *Agaricus blazei* Murrill medicinal and dietary effects. *Food Rev Int*, 11:167–72, 1995.

Mohan, A.; Sharma, S.K.; Bollineni, S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis*. 45(3):179-93, 2008.

Mohanty, S.; Patel, D.K.; Pati, S.S.; Mishra, S.K. Adjuvant therapy in cerebral malaria. *Indian J Med Res* 124:245-260, 2006.

Moreira, D.R. Perfil Oxidativo na Malária Experimental. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Pará- Núcleo de Medicina Tropical- NMT-UFPA, 2010.

Morrisette, N.S.; Sibley, L. D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 66:21–38, 2002.

Müller, S; Gilberger, T.W.; Krnajski, Z.; Lüersen, K.; Meierjohann, S.; Walter, R.D. Thioredoxin and Glutathione System of Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Protoplasma*, 217:43-49, 2001.

Muzaffar, S.; Jeremy, J.Y.; Angelini, G.; Stuart-Smith, K.; Shukla, N. Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. *Thorax*. 58:598-604, 2003.

Nagata, J.; Higashiesato, Y.; Chinen, I; Saito, M.; Iwabuchi, K.; Ono, K. Effects of Water-Soluble Hemicellulose from Soybean Hull on Serum Antibody Levels and Activation of Macrophages in rats. *J. Agric. Food. Chem.*, 49(10): 4965-4970, 2001.

Nanda, N.K.; Das, B.S. Presence of pro-oxidants in plasma of patients suffering from *falciparum* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(6):684-688, 2000.

Narsaria, N.; Mohanty, C.; Das, B.K.; Mishra, S.P. Prasad, R. Oxidative Stress in Children with Severe Malaria. *J Trop Pediatr*, 57(13), 2011.

Nuchsongsin, F.; Chotivanich, K.; Charunwatthana, P.; Fausta, O-S.; Taramelli, D.; Day, N.P.; White, N.J.; Dondorp, A.M.. Effects of Malaria Heme Products on Red Blood Cell Deformability. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(4): 617–622, 2007.

Oakley, M.; McCutchan, T.; Anantharaman, V.; Ward, J.; Faucette, L.; Erexson, C.; Mahajan, B.; Zheng, H.; Majam, V.; Aravind, L.; Kumar, S. Host Biomarkers and Biological Pathways That Are Associated with the Expression of Experimental Cerebral Malaria in Mice. *Infect. Immun.* 76(10):4518–4529, 2008.

Omodeo-Salè, F.; Motti, A.; Basilico, N.; Parapini, S.; Olliaro, P.; Taramelli, D. Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. *Blood*, 102(2): 705-711, 2003.

Oury, T.D.; Schaefer, L.M.; Fattman, C.L.; Choi, A.; Weck, K.E.; Watkins, S.C. Depletion of pulmonary EC-SOD after exposure to hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.283:L777-L784, 2002.

Pabón, A.; Carmona, J.; Burgos, L.C.; Blair, S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clinical Biochemistry*, 36: 71–78, 2003.

Penet, M.F.; Abou-Hamdan, M.; Coltel, N.; Cornille, E.; Grau, G.E.; de Regi, M.; Gharib, B. Protection against cerebral malaria by the low-molecular-weight thiol pantethine. *PNAS*.105(4):1321-1326, 2008.

Penet, M.F.; Kober, F.; Confort-Gouny, S.; Le Fur, Y.; Dalmaso, C.; Coltel N.; Liprandi, A.; Gulian, J.M.; Grau, G.E.; Cozzone, P.J.; le Viola, A. Magnetic Resonance Spectroscopy Reveals an Impaired Brain Metabolic Profile in Mice Resistant to Cerebral Malaria Infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *J Biol Chem*.282(19):14505-14514, 2007.

Percário, S. Prevenção de Aterosclerose com Suplementos Antioxidantes. São José do Rio Preto. Tese (Livre-Docente em Ciências Biológicas) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2008.

Percario, S.; Romaldini, H.; Odorizzi, VF. Papel dos radicais livres e da defesa antioxidante no Broncoespasmo agudo induzido em cobaias. LAES & HAES, 133:126-156, 2001.

Percário, S.;Vital, A.; Jablonka, F. Dosagem do malondialdeido. Newslab, 2 (6): 46-50, 1994.

Percario, S.; Naufal, A.S.; Gennari, M.S. ; Gennari, J.L. Antioxidant Activity of Edible Blushing Wood Mushroom, *Agaricus sylvaticus* Schaeff. (Agaricomycetidae) In Vitro. Int. J. Med.Mushr.,11(2):133-139, 2009.

Percário, S. Alterações oxidativas e da defesa antioxidante no broncoespasmo agudo induzido em cobaias. São Paulo. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2000.

Pino, P.; Taoufiq, Z.; Nicheu, J.; Vouldoukis, I.; Mazier, D. Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? Thromb. Haemost., 94 (2): 336-40, 2005.

Phiri, H.; Montgomery, J.; Molyneux, M.; Craig, A. Competitive endothelial adhesion between *plasmodium falciparum* isolates under physiological flow conditions. Malar J. 8: 214, 2009.

Porto, B.N.; Alves, L.S.; Fernádes, P.L.; Dutra, T.P.; Figueiredo, R.T.; Souza, A.V.; Bozza, M.T. Heme Induces Neutrophil Migration and Reatices Oxygen Species Generation Through Signaling Pathways Characteristic of Chemotatic Receptors. J Biol Chem, 282(33): 24430-24436, 2007.

Potter, S.M.; Mitchell, A.J.; Cowden, W.B.; Sanni, L.A.; Dinauer, M.; Haan, J.B.; Hunt, N.H. Phagocyte- Derived Reative Oxygen Species Do Not Influence the Progression of Murine Blood-Stage Malaria Infections. Infect Imunn, 73(8): 4941-4947, 2005.

Pouvelle, B.; Matarazzo, V.; Jurzynski, C.; Nemeth, J.; Ramharter, M.; Rougon, G.; Gysin, J. Neural Cell Adhesion Molecule, a New Cytoadhesion Receptor for *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes Capable of Aggregation. 75(7):3516-3522, 2007.

Prchal, J.T.; Gregg, X.T. Red Cell Enzymes. American Soc of Hemat, 3:19-23, 2005.  
Re R.; Pellegrini R.; Protegente A.; Pannala A.; Yang M.; Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Rad Biol Med, 26: 1231-1237, 2005.

Price, L.; Planche, T.; Rayner, C.; Krishna, S. Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria: case report and review of the literature. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.101(7): 655-659, 2007.

Rahman, I.; MacNee, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. Eur Respir J. v.53, p.534-554, 2000.

Re, R.; Pellergrini, R.; Protegente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization Assay. Free Rad Biol Med, 26:1231-1237, 1999.

Reis, P.A.; Comim, C.M.; Hermani, F.; Silva, B.; Barichello, T.; Portella, A.C.; Gomes, F.C.; Sab, I.M.; Frutuoso, V.S.; Oliveira, M.F.; Bozza, P.; Bozza F.A.; Zimmerman, G.A.; Castro-Faria-Neto, H. Cognitive Dysfunction Is Sustained after Rescue Therapy in Experimental Cerebral Malaria, and Is Reduced by Additive Antioxidant Therapy, 6(6): 1-16, 2010.

Riopel, J.; Tam, M.; Mohan, K.; Marino, M.; Stevenson, M. Granulocyte-macrophages colony stimulating factor-deficient mice have impaired resistance to blood-stage malaria. Infect Immun 69(1): 129-136, 2001.

Robbins, S.L.; Cotran, R.S.; Kumar, V. Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4ª Ed. 1991.

Rojo-Marcos, G.; Cuadros-González, J.; Mesa-Latorre, J.M.; Culebras-López, A.M.; Pablo-Sánchez, R. Case Report: Acute Respiratory Distress Syndrome in a Case of *Plasmodium ovale* Malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 79(3):391-393, 2008.

Roshanravan, B.; Kari, E.; Gilman, R. H.; Cabrera, L.; Lee, E.; Metcalfe, J.; Calderon, M.; Lescano, A. G.; Montenegro, S. H.; Calampa, C.; Vinetz, J. M. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69:45–52, 2003.

Sadavongvivad, C.; Aviado, D. Pathologic physiology and chemotherapy of *Plasmodium berghei*: VI. Mechanical properties and histological features of the lung. *Experimental Parasitology*, 24(3):313-326, 1969.

Savvides, S.N.; Scheiwein, M.; Bohme, C.C.; Arteel, G.E.; Karplus, P.A.; Becker, K.; Schirmer, R.H. Crystal Structure of the Antioxidant Enzyme Glutathione Reductase Inactivated by Peroxynitrite. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(4): 2779–2784, 2002.

Saxena, S.; Kumar, R.; Madan, T.; Gupta, V.; Muralidhar, K.; Sarma, P.U. Association of Polymorphisms in Pulmonary Surfactant Protein A1 and A2 Genes With High-Altitude Pulmonary Edema. *Chest*.128(3):1611-1619, 2005.

Scardoeli, C.A. Modulação da N-acetilcisteína nas alterações pulmonares da malária provocadas pelo *Plasmodium berghei* em camundongos. Dissertação (Mestrado) apresentada à Universidade Federal de São Paulo, 1996.

Schuster, F.L. Cultivation of *Plasmodium Spp.* *Clin Microbiol Rev*, 15(3): 355–364, 2002.

Sibmooh, N.; Yamanont, P.; Krudsood, S.; Brittenham, G.; Looareesuwan, S.; Udomsangpetch, R. oxidation of malarial lipoproteins: relation with severity and induction of endothelial expression of adhesion molecules. *Lipids in Health and Disease*, 3(15): 1-11, 2004.

Snow, R.W.; Guerra, C.A.; Mutheu, J.J.; Hay, S.I. International Funding for Malaria Control in Relation to Populations at Risk of Stable *Plasmodium falciparum* Transmission. PLoS Medicine, 5(7):1068- 1078, 2008.

Soares, A.A.; Souza, C.G.; Daniel, F.M.; Ferrari, G.P.; Costa, S.M; Peralta, R.M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. Food Chemistry, 112:775-781, 2009.

Sobolewski, P.; Gramaglia, I.; van der Heyde, H. *Plasmodium berghei* Resists Killing by Reactive Oxygen Species. Infect. Immun., 73(10): 6704-6710, 2005.

Sohail, M.; Kaul, A.; Raziuddin, M. Decreased Glutathione-S-transferase Activity: Diagnostic and Protective Role in vivax Malaria. Clin Biochem, 40: 377-382, 2007.

Sorimachi, K.; Akimoto, K.; Ikehara, Y.; Inafuku, K.; Okubo, A.; Yamazaki, S. Secretion of TNF- $\alpha$ , IL-8 and Nitric Oxide in Macrophages Activated with *Agaricus blazei* Murril Fractions in vitro. Cell structure and function, 26: 103-108, 2001.

Straface, E.; Rivabene, R.; Masella, R.; Santulli, M.; Paganelli, R.; Malorni, W. Structural changes of the erythrocyte as a marker of non-insulin dependent diabetes: protective effects of N-acetylcysteine. Biochem Biophys Res Commun 290: 1393–1398, 2002.

Stocker, R.; Hunt, N.H.; Buffinton, G.D.; Weidemann, M.J.; Lewis-Hughes, P.H.; Clark, I.A. Oxidative Stress and Protective Mechanisms in Relation to *Plasmodium vinckei* Load. Medical Sciences 82: 548-551, 1985.

Suh, K.N.; Kain, K.C.; Keystone, J.S. Malaria. Cmaj, 170(11): 1693-1702, 2004.

Tanneur, V.; Durantou, C.; Brand, V.B.; Sandu, C.D.; Akkaya, C.; Kasinathan, R.S.; Gachet, C.; Sluyter, R.; Barden, J.A.; Wiley, J.S.; Lang, F.; Huber, S.M. Purinoceptors are involved in the induction of an osmolyte permeability in malaria-infected and oxidized human erythrocytes. The FASEB Journal, 1-27, 2005.

Taylor, W.R.; White, N.J. Malaria and the lung. *Clin. Chest Med.* 23, 457–468, 2002.

Taylor, W.R.; Canon, V.; White, N.J. Pulmonary manifestations of malaria: recognition and anagement. *Treat Respir Med.* 5(6):419-428, 2006.

Toler, S. The plasmodial apicoplast was retained under evolutionary selective pressure to assuage of blood stage oxidative stress. *Med Hypotheses*, 65(4): 683-690, 2005.

Treepasertsuk, S.; Krudsood, S.; Tosukhowong. T. N-acetylcysteine in severe falciparum malaria in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*;34:37–42, 2003.

Trivedi, V.; Chand, P.; Srivastava, K.; Puri, S.K.; Maulik, P.R.; Bandyopadhyay, U. Clotrimazole Inhibits Hemoperoxidase of *Plasmodium falciparum* and Induces Oxidative Stress. *T Journal of Biolog Chem*, 280(50): 41129–41136, 2005.

Van den Steen, P.E.; Geurts, N.; Deroost, K.; Van Aelst, I.; Verhenne, S.; Heremans, H.; Van Damme, J.; Opdenakker, G. Immunopathology and Dexamethasone Therapy in a New Model for Malaria-associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 181: 957–968, 2010.

Wasser, S.P.; Didukh, M.Y.; Amazonas, M.A; Nevo, E.; Stamets, P.; Eira, A.F. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake Mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4: 267-290, 2002.

Wasser, S.P.; Weis, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*, 19: 65-96, 1999.

Watt, G.; Jongsakul, K.; Ruangvirayuth, R. A Pilot Study of N-Acetylcysteine as Adjunctive Therapy for Severe Malaria. *Q j med*, 295: 285-290, 2002.

Wilmanski, J.; Siddiqi, M.; Deitch, E.A.; Spolarics, Z. Augmented IL-10 production and redox-dependent signaling pathways in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mouse peritoneal macrophages. *T J Leukocyte*, 78: 85–94, 2005.

World Health Organization (WHO). World Malaria Report. 1-66, 2009.

Yazar, S.; Killic, E.; Saraymen, R.; Ozbilge, H. Serum malondialdehyde levels in patients infected with *Plasmodium vivax*. *West. Indian Med. J.*, 53 (3):147-9, 2004.

Yeo, T.W.; Lampah, D.A.; Gitawati, R.; Tjitra, E.; Kenangalem, E.; McNeil, Y.R.; Darcy, C.J.; Granger, D.L.; Price, R.N.; Duffull, S.B.; Celermajer, D.S.; Anstey, N.M. Impaired nitric oxide bioavailability and L -arginine–reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. *JEM*.204(11):2693-2704, 2007.

Yeo, T.W.; Lampah, D.A.; Gitawati, R.; Tjitra, E.; Kenangalem, E.; Piera, K.; Price, R.N.; Duffull, S.B.; Celermajer, D.S.; Anstey, N.M. Angiopoietin-2 is associated with decreased endothelial nitric oxide and poor clinical outcome in severe falciparum malaria. *PNAS*. 105(44):17097-17102, 2008.

Yoshimoto, T.; Takahama, Y.; Wang, C.R.; Yoneto, T.; Waki, S.; Nariuchi, H. A Pathogenic Role of IL-12 in Blood-Stage Murine Malaria Lethal Strain *Plasmodium berghei* NK65 Infection. *J Immunol*, 160: 5500–5505 1998.

Yuminamochi, E.; Koike, T.; Takeda, K.; Horiuchi, I.; Okumura, K. Interleukin-12- and interferon- $\gamma$ -mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei* Murill. *Immunology*, 121: 197–206, 2007.

Zhu, J.; Krishnegowda, G.; Gowda, D.C. Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 9, 8617–8627, 2005.

## 9- APÊNDICES

**Apêndice 1:** Valores de Parasitemia (%) para cada animal em 1 dia de infecção.

| Animal      | Parasitemia (%)   |                  |                            |
|-------------|-------------------|------------------|----------------------------|
|             | Controle Positivo | N-acetilcisteína | <i>Agaricus sylvaticus</i> |
| 1           | 1,5               | 0,5              | 0,5                        |
| 2           | 0,5               | 1                | 0,5                        |
| 3           | 1                 | 1                | 1,5                        |
| 4           | 1                 | 0,5              | 1,5                        |
| 5           | 2                 | 1                | 1                          |
| 6           | 1                 | 1,5              | 1                          |
| 7           | 1                 | 1                | 1,5                        |
| 8           | 0,5               | 1,5              | 1,5                        |
| 9           | 0,5               | 2                | 0,5                        |
| 10          | 1                 | 0,5              | 1                          |
| <b>X±SD</b> | 1,00±0,47         | 1,05±0,50        | 1,05±0,44                  |

\* = Pontos excluidos; † = animais falecidos.

|                 |       |       |        |
|-----------------|-------|-------|--------|
| <b>Q1</b>       | 0,625 | 0,625 | 0,625  |
| <b>Q3</b>       | 1     | 1,375 | 1,5    |
| <b>DJ</b>       | 0,375 | 0,75  | 0,875  |
| <b>3/2DJ</b>    | 0,562 | 1,125 | 1,312  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 0,062 | -0,5  | -0,687 |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 1,562 | 2,5   | 2,812  |
| <b>Min.</b>     | 0,5   | 0,5   | 0,5    |
| <b>Max.</b>     | 1,5   | 2     | 1,5    |

**Apêndice 2:** Valores de Parasitemia (%) para cada animal em 3 dias de infecção.

| Animal      | Parasitemia (%)   |                  |                            |
|-------------|-------------------|------------------|----------------------------|
|             | Controle Positivo | N-acetilcisteína | <i>Agaricus sylvaticus</i> |
| 1           | 3                 | 12               | 4                          |
| 2           | 4                 | 6                | 8                          |
| 3           | 6                 | 10               | 5                          |
| 4           | 6                 | 8                | 7                          |
| 5           | 15                | 12               | 5                          |
| 6           | 12                | 4                | 4                          |
| 7           | 16                | 8                | 10                         |
| 8           | 12                | 4                | 8                          |
| 9           | 15                | 15               | 3                          |
| 10          | 14                | 4                | 4                          |
| <b>X±SD</b> | 10,30±5,01        | 8,30±3,89        | 5,80±2,30                  |

\* = Pontos excluidos; †= animais falecidos.

|                 |        |      |        |
|-----------------|--------|------|--------|
| <b>Q1</b>       | 6      | 4,5  | 4      |
| <b>Q3</b>       | 14,75  | 11,5 | 7,75   |
| <b>DJ</b>       | 8,75   | 7    | 3,75   |
| <b>3/2DJ</b>    | 13,125 | 10,5 | 5,625  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | -7,125 | -6   | -1,62  |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 27,875 | 22   | 13,375 |
| <b>Min.</b>     | 3      | 4    | 4      |
| <b>Max.</b>     | 16     | 15   | 10     |

**Apêndice 3:** Valores de Parasitemia (%) para cada animal em 5 dias de infecção.

| Animal      | Parasitemia (%)   |                  |                            |
|-------------|-------------------|------------------|----------------------------|
|             | Controle Positivo | N-acetilcisteína | <i>Agaricus sylvaticus</i> |
| 1           | 35                | 30               | 30*                        |
| 2           | 32                | 28               | 25                         |
| 3           | 38                | 25               | 15                         |
| 4           | 35                | 28               | 20                         |
| 5           | 20*               | 20               | 12                         |
| 6           | 30                | 24               | 15                         |
| 7           | 35                | 18               | 18                         |
| 8           | 33                | 15               | 15                         |
| 9           | 18*               | 22               | 10                         |
| 10          | †                 | 6                | 8                          |
| <b>X±SD</b> | 34,0±2,58         | 21,60±7,24       | 15,33±5,19                 |

\* = Pontos excluidos; †= animais falecidos.

|                 |       |        |    |
|-----------------|-------|--------|----|
| <b>Q1</b>       | 32,5  | 18,5   | 12 |
| <b>Q3</b>       | 35    | 27,25  | 18 |
| <b>DJ</b>       | 2,5   | 8,75   | 6  |
| <b>3/2DJ</b>    | 3,75  | 13,125 | 9  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 28,75 | 5,375  | 3  |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 38,75 | 40,375 | 27 |
| <b>Min.</b>     | 30    | 6      | 8  |
| <b>Max.</b>     | 38    | 30     | 25 |

**Apêndice 4:** Valores de Parasitemia (%) para cada animal em 7 dias de infecção.

| Animal      | Parasitemia (%)   |                  |                            |
|-------------|-------------------|------------------|----------------------------|
|             | Controle Positivo | N-acetilcisteína | <i>Agaricus sylvaticus</i> |
| 1           | 45                | 48               | 30                         |
| 2           | 60                | 40               | 40                         |
| 3           | 58                | 55               | 32                         |
| 4           | 42                | 50               | 42                         |
| 5           | 44                | 60               | 35                         |
| 6           | 45                | 45               | 45                         |
| 7           | 35                | 45               | 55                         |
| 8           | †                 | 42               | 52                         |
| 9           | †                 | †                | †                          |
| 10          | †                 | †                | †                          |
| <b>X±SD</b> | 47,00±8,90        | 48,12±6,71       | 41,37±9,04                 |

\* = Pontos excluidos; †= animais falecidos.

|                 |       |       |       |
|-----------------|-------|-------|-------|
| <b>Q1</b>       | 43    | 44,25 | 34,25 |
| <b>Q3</b>       | 51,5  | 51,25 | 46,75 |
| <b>DJ</b>       | 8,5   | 7     | 12,5  |
| <b>3/2DJ</b>    | 12,75 | 10,5  | 18,75 |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 30,25 | 33,75 | 15,5  |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 64,25 | 61,75 | 65,5  |
| <b>Min.</b>     | 35    | 40    | 30    |
| <b>Max.</b>     | 60    | 60    | 55    |

**Apêndice 5:** Valores de Parasitemia (%) para cada animal em 10 dias de infecção.

| Animal      | Parasitemia (%)   |                  |                            |
|-------------|-------------------|------------------|----------------------------|
|             | Controle Positivo | N-acetilcisteína | <i>Agaricus sylvaticus</i> |
| 1           | 42                | 50*              | 25                         |
| 2           | 65                | 35               | 40                         |
| 3           | 58                | 38               | 28                         |
| 4           | 42                | 35               | 35                         |
| 5           | 45                | 34               | 38                         |
| 6           | 55                | 32               | †                          |
| 7           | 58                | †                | †                          |
| 8           | †                 | †                | †                          |
| 9           | †                 | †                | †                          |
| 10          | †                 | †                | †                          |
| <b>X±SD</b> | 52,14±9,12        | 34,8±2,17        | 33,20±6,46                 |

\* = Pontos excluidos; †= animais falecidos.

|                 |       |      |    |
|-----------------|-------|------|----|
| <b>Q1</b>       | 43,5  | 34   | 28 |
| <b>Q3</b>       | 58    | 35   | 38 |
| <b>DJ</b>       | 14,5  | 1    | 10 |
| <b>3/2DJ</b>    | 21,75 | 1,5  | 15 |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 21,75 | 31,5 | 13 |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 79,75 | 38,5 | 53 |
| <b>Min.</b>     | 42    | 32   | 25 |
| <b>Max.</b>     | 65    | 38   | 40 |

**Apêndice 6:** Valores de TEAC (mmol/L) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 1 dia de infecção.

| Animal      | Controle Negativo |           | Controle Positivo |            | N-acetilcisteína |          | <i>Agaricus sylvaticus</i> |           |
|-------------|-------------------|-----------|-------------------|------------|------------------|----------|----------------------------|-----------|
|             | TEAC (P)          | TEAC (C)  | TEAC (P)          | TEAC (C)   | TEAC (P)         | TEAC (C) | TEAC (P)                   | TEAC (C)  |
| 1           | 5,25              | 5,88      | 2,99              | 11,91      | 3,37             | 15,11    | 9,254                      | 14,28     |
| 2           | 4,78              | 11,30     | 3,57              | 12,82      | 1,21             | 14,61    | 9,42                       | 14,07     |
| 3           | 5,14              | 8,07      | 3,98              | 15,03      | 1,79             | 16,36    | 8,538                      | 13,21     |
| 4           | 2,94              | 10,40     | 3,47              | 14,08      | 2,05             | 13,44    | 8,33                       | 14,12     |
| 5           | 3,50              | 6,67      | 3,51              | 11,96      | 2,6              | 14,08    | 13,32                      | 17,91*    |
| 6           | 5,43              | 8,44      | 1,95              | 10,43      | 3,08             | 15,67    | 5,11                       | 13,96     |
| 7           | 2,91              | 8,95      | 1,95              | 16,8       | 2,86             | 15,19    | 11,29                      | 13,52     |
| 8           | 1,79              | 3,02      | 4,77*             | 9,73       | 4,60             | 17,6     | 11,81                      | 15,22     |
| 9           | 4,03              | 5,22      | 3,22              | 10,28      | 4,12             | 15,89    | 10,30                      | 14,48     |
| 10          | 3,06              | 4,80      | 2,87              | 13,85      | 5,86             | 18,6*    | 8,33                       | 13,17     |
| <b>X±SD</b> | 3,88±1,23         | 7,27±2,61 | 3,06±0,71         | 12,69±2,27 | 3,15±1,40        | 15,3±1,4 | 9,57±2,28                  | 14,0±0,65 |

\* = Pontos excluidos; †= animais falecidos.

|                 |       |        |       |        |        |       |        |       |
|-----------------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|
| <b>Q1</b>       | 2,97  | 5,385  | 2,866 | 10,80  | 2,184  | 14,61 | 8,382  | 13,52 |
| <b>Q3</b>       | 5,05  | 8,822  | 3,515 | 14,022 | 3,932  | 15,89 | 11,042 | 14,28 |
| <b>DJ</b>       | 2,08  | 3,437  | 0,649 | 3,222  | 1,748  | 1,28  | 2,660  | 0,76  |
| <b>3/2DJ</b>    | 3,12  | 5,156  | 0,973 | 4,834  | 2,622  | 1,92  | 3,991  | 1,14  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | -0,15 | 0,229  | 1,892 | 5,966  | -0,437 | 12,69 | 4,391  | 12,38 |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 8,17  | 13,979 | 4,488 | 18,856 | 6,554  | 17,81 | 15,033 | 15,42 |
| <b>Min.</b>     | 1,79  | 3,02   | 1,95  | 9,73   | 1,215  | 13,44 | 5,11   | 13,17 |
| <b>Max.</b>     | 5,43  | 11,30  | 3,978 | 15,03  | 5,86   | 17,6  | 13,316 | 15,22 |

**Apêndice 7:** Valores de TEAC (mmol/L) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 3 dias de infecção.

| Animal      | Controle Negativo |           | Controle Positivo |            | N-acetilcisteína |            | <i>Agaricus sylvaticus</i> |            |
|-------------|-------------------|-----------|-------------------|------------|------------------|------------|----------------------------|------------|
|             | TEAC (P)          | TEAC (C)  | TEAC (P)          | TEAC (C)   | TEAC (P)         | TEAC (C)   | TEAC (P)                   | TEAC (C)   |
| 1           | 3,28              | 7,71      | 4,52              | 13,43      | 6,43             | 16,75      | 17,87*                     | 21,14      |
| 2           | 1,76              | 5,99      | 3,91              | 14,54      | 8,07             | 21,47      | 11,08                      | 14,85      |
| 3           | 0,29              | 7,89      | 6,82*             | 11,91      | 6,09             | 22,05      | 14,09                      | 17,16      |
| 4           | 3,38              | 5,23      | 4,69              | 9,37       | 6,51             | 19,11      | 13,21                      | 11,09      |
| 5           | 3,15              | 2,67      | 2,59              | 16,16      | 6,10             | 18,89      | 12,173                     | 18,06      |
| 6           | 2,52              | 3,67      | 4,33              | 15,11      | 7,13             | 20,44      | 14,25                      | 15,35      |
| 7           | 2,21              | 3,43      | 2,46*             | 13,47      | 7,13             | 22,50      | 14,20                      | 16,88      |
| 8           | 0,72              | 4,03      | 3,60              | 10,46      | 4,09*            | 19,70      | 14,56                      | 19,19      |
| 9           | 3,55              | 3,05      | 4,33              | 8,20       | 14,67*           | 19,29      | 14,15                      | 14,88      |
| 10          | 2,72              | 2,92      | 4,01              | 11,98      | 3,39*            | 18,17      | 11,03                      | 18,56      |
| <b>X±SD</b> | 2,36±1,13         | 4,66±1,95 | 4,00±0,66         | 12,46±2,56 | 6,78±0,71        | 19,84±1,80 | 13,05±1,4                  | 16,72±2,82 |

\* = Pontos excluidos; †= animais falecidos.

|                 |       |        |       |        |       |        |        |        |
|-----------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|
| <b>Q1</b>       | 1,872 | 3,145  | 3,832 | 10,822 | 6,263 | 18,945 | 11,893 | 14,997 |
| <b>Q3</b>       | 3,247 | 5,8    | 4,377 | 14,272 | 7,135 | 21,212 | 14,185 | 18,435 |
| <b>DJ</b>       | 1,375 | 2,655  | 0,544 | 3,45   | 0,871 | 2,267  | 2,292  | 3,437  |
| <b>3/2DJ</b>    | 2,062 | 3,982  | 0,817 | 5,175  | 1,307 | 3,401  | 3,438  | 5,156  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | -0,19 | -0,837 | 3,016 | 5,647  | 4,956 | 15,544 | 8,456  | 9,841  |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 5,31  | 9,782  | 5,194 | 19,447 | 8,442 | 24,614 | 17,623 | 23,591 |
| <b>Min.</b>     | 0,29  | 2,92   | 2,596 | 8,20   | 6,090 | 16,75  | 11,03  | 11,09  |
| <b>Max.</b>     | 3,55  | 7,71   | 4,690 | 16,16  | 8,070 | 22,05  | 14,562 | 21,14  |

**Apêndice 8:** Valores de TEAC (mmol/L) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 5 dias de infecção.

| Animal      | Controle Negativo |           | Controle Positivo |           | N-acetilcisteína |            | <i>Agaricus sylvaticus</i> |            |
|-------------|-------------------|-----------|-------------------|-----------|------------------|------------|----------------------------|------------|
|             | TEAC (P)          | TEAC (C)  | TEAC (P)          | TEAC (C)  | TEAC (P)         | TEAC (C)   | TEAC (P)                   | TEAC (C)   |
| 1           | 5,13              | 10,04     | 4,88              | 10,02     | 5,63             | 18,91      | 24,43                      | 13,59      |
| 2           | 4,25              | 9,07      | 9,43              | 13,51     | 8,64             | 15,13      | 19,92                      | 15,38      |
| 3           | 8,05              | 8,44      | 10,14             | 9,58      | 6,36             | 13,80      | 24,61                      | 16,76      |
| 4           | 7,55              | 6,78      | 8,45              | 9,25      | 5,47             | 9,95       | 17,05                      | 15,20      |
| 5           | 3,7               | 9,53      | 10,30             | 8,42      | 6,20             | 18,7       | 18,10                      | 13,17      |
| 6           | 3,95              | 10,29     | 5,75              | 10,56     | 7,97             | 13,55      | 21,63                      | 10,03      |
| 7           | 5,95              | 6,84      | 5,51              | 9,07      | 6,56             | 12,47      | 21,15                      | 14,53      |
| 8           | 4,99              | 8,13      | 5,95              | 12,47     | 5,68             | 13,40      | 25,72                      | 12,66      |
| 9           | 1,14*             | 8,16      | 5,91              | 10,28     | 7,60             | 9,35       | 10,72                      | 11,54      |
| 10          | 4,53              | 4,19      | †                 | †         | 4,59             | 16,83      | 13,56                      | 13,79      |
| <b>X±SD</b> | 5,34±1,55         | 8,15±1,83 | 7,37±2,18         | 9,95±1,23 | 6,47±1,25        | 14,21±3,26 | 19,69±4,9                  | 13,66±1,96 |

\* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

|                 |      |        |        |        |      |        |        |        |
|-----------------|------|--------|--------|--------|------|--------|--------|--------|
| <b>Q1</b>       | 4,25 | 7,162  | 5,749  | 9,205  | 5,64 | 12,702 | 17,312 | 12,787 |
| <b>Q3</b>       | 5,95 | 9,415  | 9,43   | 10,35  | 7,34 | 16,405 | 23,73  | 15,032 |
| <b>DJ</b>       | 1,7  | 2,252  | 3,681  | 1,145  | 1,70 | 3,702  | 6,417  | 2,245  |
| <b>3/2DJ</b>    | 2,55 | 3,3787 | 5,521  | 1,717  | 2,55 | 5,554  | 9,626  | 3,367  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 1,7  | 3,784  | 0,227  | 7,487  | 3,09 | 7,149  | 7,686  | 9,42   |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 8,5  | 12,794 | 14,951 | 12,067 | 9,89 | 21,959 | 33,356 | 18,4   |
| <b>Min.</b>     | 3,7  | 4,19   | 4,88   | 8,42   | 4,59 | 9,35   | 10,72  | 10,03  |
| <b>Max.</b>     | 8,05 | 10,29  | 10,30  | 12,47  | 8,64 | 18,91  | 24,61  | 16,76  |

**Apêndice 9:** Valores de TEAC (mmol/L) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 7 dias de infecção.

| Animal                                      | Controle Negativo |           | Controle Positivo |           | N-acetilcisteína |            | <i>Agaricus sylvaticus</i> |            |
|---|-------------------|-----------|-------------------|-----------|------------------|------------|----------------------------|------------|
|   | TEAC (P)          | TEAC (C)  | TEAC (P)          | TEAC (C)  | TEAC (P)         | TEAC (C)   | TEAC (P)                   | TEAC (C)   |
| 1   | 4,90              | 9,21      | 5,76              | 8,19      | 21,36            | 14,99      | 26,62                      | 13,92      |
| 2   | 4,55              | 8,17      | 4,56              | 9,13      | 18,04            | 17,41      | 22,14                      | 17,68*     |
| 3   | 5,52              | 9,59      | 4,63              | 7,50      | 18,20            | 14,54      | 22,61                      | 12,76      |
| 4   | 5,31              | 8,97      | 5,76              | 7,72      | 22,56            | 15,34      | 24,15                      | 15,5       |
| 5   | 3,98              | 8,85      | 9,26*             | 11,79     | 7,81             | 16,95      | 25,68                      | 16,02      |
| 6   | 5,19              | 8,62      | 2,89*             | 9,46      | 13,32            | 16,92      | 19,86                      | 14,99      |
| 7   | 5,37              | 7,98      | 5,60              | 7,35      | 11,91            | 15,5       | 24,32                      | 14,76      |
| 8   | 4,0               | 7,63      | †                 | †         | 13,63            | 13,44      | 14,98*                     | 14,48      |
| 9   | 5,22              | 9,15      | †                 | †         | †                | †          | †                          | †          |
| 10  | 4,45              | 10,13     | †                 | †         | †                | †          | †                          | †          |
| <b>X±SD</b>                                 | 4,85±0,57         | 8,83±0,76 | 5,26±0,61         | 8,73±1,57 | 15,85±5,03       | 15,63±1,36 | 23,63±2,28                 | 14,63±1,07 |
| * = Pontos excluidos; †= animais falecidos. |                   |           |                   |           |                  |            |                            |            |
| <b>Q1</b>                                   | 4,47              | 8,28      | 4,63              | 7,61      | 12,96            | 14,88      | 22,37                      | 14,20      |
| <b>Q3</b>                                   | 5,29              | 9,19      | 5,76              | 9,29      | 18,99            | 16,93      | 25,00                      | 15,24      |
| <b>DJ</b>                                   | 0,81              | 0,91      | 1,13              | 1,68      | 6,02             | 2,05       | 2,62                       | 1,04       |
| <b>3/2DJ</b>                                | 1,22              | 1,37      | 1,69              | 2,53      | 9,03             | 3,07       | 3,94                       | 1,57       |
| <b>Q1-3/2DJ</b>                             | 3,26              | 6,91      | 2,94              | 5,08      | 3,93             | 11,80      | 18,44                      | 12,63      |
| <b>Q3+3/2DJ</b>                             | 6,51              | 10,56     | 7,45              | 11,82     | 28,02            | 20,00      | 28,94                      | 16,81      |
| <b>Min.</b>                                 | 3,98              | 7,63      | 4,56              | 7,35      | 7,81             | 13,44      | 19,86                      | 12,76      |
| <b>Max.</b>                                 | 5,37              | 10,13     | 5,76              | 11,79     | 22,56            | 17,41      | 26,62                      | 16,02      |

**Apêndice 10:** Valores de TEAC (mmol/L) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 10 dias de infecção.

| Animal      | Controle Negativo |           | Controle Positivo |            | N-acetilcisteína |            | <i>Agaricus sylvaticus</i> |            |
|-------------|-------------------|-----------|-------------------|------------|------------------|------------|----------------------------|------------|
|             | TEAC (P)          | TEAC (C)  | TEAC (P)          | TEAC (C)   | TEAC (P)         | TEAC (C)   | TEAC (P)                   | TEAC (C)   |
| 1           | 4,74              | 5,08      | 12,6              | 9,82       | 19,85            | 10,49      | 26,35                      | 12,83      |
| 2           | 2,26              | 5,2       | 21,08             | 11,63      | 15,39            | 11,92      | 30,87                      | 11,59      |
| 3           | 5,49              | 2,2       | 13,8              | 8,05       | 18,71            | 13,06      | 20,07                      | 16,02      |
| 4           | 2,48              | 5,64      | 8,18              | 10,95      | 13,81            | 9,39       | 35,72                      | 14,94      |
| 5           | 1,96              | 8,35      | 16,47             | 12,95      | 20,45            | 9,74       | 27,38                      | 12,63      |
| 6           | 0,49              | 7,7       | 8,27              | 11,58      | 23,52            | 13,5       | †                          | †          |
| 7           | 4,49              | 3,63      | 14,73             | 12,31      | †                | †          | †                          | †          |
| 8           | 6,21              | 8,55      | †                 | †          | †                | †          | †                          | †          |
| 9           | 4,42              | 7,68      | †                 | †          | †                | †          | †                          | †          |
| 10          | 5,46              | 4,37      | †                 | †          | †                | †          | †                          | †          |
| <b>X±SD</b> | 3,8±1,87          | 5,84±2,15 | 13,59±4,55        | 11,04±1,65 | 18,62±3,53       | 11,35±1,73 | 28,08±5,78                 | 13,06±1,82 |

\* = Pontos excluidos; †= animais falecidos.

|                 |        |        |        |        |       |        |       |        |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|
| <b>Q1</b>       | 2,315  | 4,547  | 10,435 | 10,385 | 16,22 | 9,927  | 26,35 | 12,63  |
| <b>Q3</b>       | 5,28   | 7,695  | 15,601 | 11,97  | 20,3  | 12,775 | 30,87 | 14,94  |
| <b>DJ</b>       | 2,965  | 3,147  | 5,166  | 1,585  | 4,08  | 2,847  | 4,52  | 2,31   |
| <b>3/2DJ</b>    | 4,447  | 4,7212 | 7,750  | 2,377  | 6,12  | 4,271  | 6,78  | 3,465  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | -2,132 | -0,174 | 2,685  | 8,007  | 10,1  | 5,656  | 19,57 | 9,165  |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 9,727  | 12,416 | 23,351 | 14,347 | 26,42 | 17,046 | 37,65 | 18,405 |
| <b>Min.</b>     | 0,49   | 2,2    | 8,18   | 8,05   | 13,81 | 9,39   | 20,07 | 11,59  |
| <b>Max.</b>     | 6,21   | 8,55   | 21,08  | 12,95  | 23,52 | 13,5   | 35,72 | 16,02  |

**Apêndice 11:** Valores de MDA (nmol/mL) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 1 dia de infecção.

| Animal          | Controle Negativo |               | Controle Positivo |              | N-acetilcisteína |               | <i>Agaricus sylvaticus</i> |              |
|-----------------|-------------------|---------------|-------------------|--------------|------------------|---------------|----------------------------|--------------|
|                 | MDA (P)           | MDA (C)       | MDA (P)           | MDA (C)      | MDA (P)          | MDA (C)       | MDA (P)                    | MDA (C)      |
| 1               | 1241,34           | 1206,86       | 986,600           | 3100,17      | 12825,89         | 4015,83       | 1973,21                    | 2020,99      |
| 2               | 1173,92           | 2717,23       | 627,84            | 3119,79      | 6457,79          | 4022,37       | 3677,73                    | 2282,61      |
| 3               | 1167,75           | 2216,42       | 1345,37           | 4892,25*     | 10045,45         | 3937,34       | 1345,37                    | 2321,86      |
| 4               | 1372,85           | 3094,78       | 3497,97           | 3714,97      | 3318,58          | 3401,03       | 4215,5                     | 2204,13      |
| 5               | 1551,06           | 1173,88       | 2152,60           | 3100,17      | 7534,09          | 3773,83       | 6277,6                     | 1935,97      |
| 6               | 1176,67           | 911,19        | 1614,45           | 2694,66      | 7803,16          | 4048,53       | 16772,32*                  | 2119,10      |
| 7               | 1239,07           | 3652,98       | 986,61            | 2524,61      | 6009,33          | 1425,82       | 1076,29                    | 2138,72      |
| 8               | 864,51            | 856,29        | 1973,21           | 791,39*      | 3587,66          | 3028,22       | 2421,67                    | 2367,64      |
| 9               | 1337,12           | 1789,55       | 2959,82           | 1033,39*     | 25562,10*        | 2164,89       | 2421,67                    | 2459,21      |
| 10              | 1684,79           | 952,24        | 4484,58           | 2799,31      | 16054,79         | 784,85        | 14978,49*                  | 856,80*      |
| <b>X±SD</b>     | 1282,5±132,6      | 1857,1±1013,0 | 2062,9±1239,9     | 3007,7±388,3 | 8181,9±4183,8    | 3060,3±1195,4 | 2926,1±1723,7              | 2205,6±169,1 |
| <b>Q1</b>       | 1175,98           | 1007,65       | 1076,30           | 388,30675    | 6009,33          | 2380,72       | 1816,25                    | 2119,10      |
| <b>Q3</b>       | 1346,05           | 2592,02       | 2758,02           | 2746,985     | 10045,45         | 3996,21       | 3812,17                    | 2321,86      |
| <b>DJ</b>       | 170,07            | 1584,37       | 1681,72           | 3109,98      | 4036,12          | 1615,49       | 1995,92                    | 202,75       |
| <b>3/2DJ</b>    | 255,10            | 2376,56       | 2522,58           | 362,995      | 6054,18          | 2423,23       | 2993,88                    | 304,13       |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 920,88            | -1368,91      | -1446,28          | 544,4925     | -44,85           | -42,51        | -1177,63                   | 1814,97      |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 1601,16           | 4968,59       | 5280,59           | 2202,4925    | 16099,63         | 6419,44       | 6806,06                    | 2625,99      |
| <b>Min.</b>     | 1167,75           | 856,29        | 627,84            | 2524,61      | 3318,58          | 784,85        | 1076,29                    | 1935,97      |
| <b>Max.</b>     | 1551,06           | 3652,98       | 4484,58           | 3119,79      | 12825,89         | 4048,53       | 6277,60                    | 2459,21      |

\* = Pontos excluídos; † = animais falecidos.

**Apêndice 12:** Valores de MDA (nmol/mL) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 3 dias de infecção.

| Animal      | Controle Negativo |              | Controle Positivo |              | N-acetilcisteína |              | <i>Agaricus sylvaticus</i> |              |
|-------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|------------------|--------------|----------------------------|--------------|
|             | MDA (P)           | MDA (C)      | MDA (P)           | MDA (C)      | MDA (P)          | MDA (C)      | MDA (P)                    | MDA (C)      |
| 1           | 2173,44           | 1055,31      | 1165,99           | 2328,40      | 6994,16*         | 1314,62*     | 2959,07                    | 3643,03      |
| 2           | 1060,78           | 2364,18      | 1614,44           | 2773,15      | 1434,7           | 3956,97      | 1345,03                    | 3152,49      |
| 3           | 623,86            | 2306,72      | 1883,52           | 3329,08      | 3138,41          | 3662,65      | 986,35                     | 3492,59      |
| 4           | 802,27            | 2503,73      | 1255,68           | 2642,34      | 3048,74          | 1805,16*     | 1793,37                    | 2818,93      |
| 5           | 1640,21           | 1518,66      | 538,15            | 2786,23      | 1703,71          | 4225,12      | 1345,03                    | 3211,36      |
| 6           | 1738,26           | 2766,42      | 1165,99           | 2387,26      | 6187,15*         | 3453,35      | 717,4                      | 3250,60      |
| 7           | 2240,54           | 968,66       | 1973,21           | 2609,64      | 1614,04          | 5493,97      | 1793,37                    | 3329,08      |
| 8           | 1551,06           | 1329,57      | 2331,98           | 1563,16*     | 2062,38          | 3440,27      | 1076,02                    | 2812,39      |
| 9           | 1149,93           | 1272,39      | 2242,29           | 2106,02      | 3676,42          | 3270,22      | 2779,73                    | 2191,05      |
| 10          | 1996,77           | 886,57       | 1524,757          | 2760,07      | 2510,72          | 3047,85      | 2152,05                    | 2020,99*     |
| <b>X±SD</b> | 1497,7±567,4      | 1697,2±711,6 | 1569,6±556,5      | 2635,8±349,1 | 2398,6±824,3     | 3818,8±773,4 | 1694,7±751,9               | 3100,2±436,9 |

\* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

|                 |         |         |         |         |         |           |         |         |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|
| <b>Q1</b>       | 1083,07 | 1109,58 | 1188,41 | 2387,26 | 1681,29 | 3397,7575 | 1143,27 | 2818,93 |
| <b>Q3</b>       | 1932,14 | 2349,81 | 1950,79 | 2773,15 | 3071,16 | 4024,0075 | 2062,38 | 3329,08 |
| <b>DJ</b>       | 849,07  | 1240,23 | 762,37  | 385,89  | 1389,86 | 626,25    | 919,11  | 510,15  |
| <b>3/2DJ</b>    | 1273,61 | 1860,35 | 1143,56 | 578,83  | 2084,80 | 939,375   | 1378,66 | 765,23  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | -190,54 | -750,76 | 44,85   | 1808,43 | -403,50 | 2458,3825 | -235,39 | 2053,70 |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 3205,75 | 4210,16 | 3094,35 | 3351,98 | 5155,95 | 4963,3825 | 3441,04 | 4094,32 |
| <b>Min.</b>     | 623,86  | 886,57  | 538,15  | 2106,02 | 1434,7  | 3047,85   | 717,4   | 2191,05 |
| <b>Max.</b>     | 2240,54 | 2766,42 | 2242,29 | 3329,08 | 3676,42 | 5493,97   | 2959,07 | 3643,03 |

**Apêndice 13:** Valores de MDA (nmol/mL) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 5 dias de infecção.

| Animal      | Controle Negativo |              | Controle Positivo |              | N-acetilcisteína |              | <i>Agaricus sylvaticus</i> |              |
|-------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|------------------|--------------|----------------------------|--------------|
|             | MDA (P)           | MDA (C)      | MDA (P)           | MDA (C)      | MDA (P)          | MDA (C)      | MDA (P)                    | MDA (C)      |
| 1           | 1515,41           | 2803,02      | 7532,18           | 2177,97      | 6456,15          | 2923,58      | 7621,85                    | 2485,37      |
| 2           | 909,24            | 1699,25      | 5918,14           | 3152,49*     | 6814,83          | 2223,75      | 5918,14                    | 2570,39      |
| 3           | 1025,13           | 2413,43      | 3945,43           | 1451,98      | 3945,43          | 2106,02      | 7263,17                    | 1425,25      |
| 4           | 1488,66           | 1674,63      | 7173,5            | 2746,98      | 5469,79          | 1484,68      | 7352,84                    | 1026,92      |
| 5           | 1167,75           | 2035,82      | 4752,45           | 2230,29      | 3407,41          | 2406,88      | 896,69                     | 1131,49      |
| 6           | 1613,46           | 2257,46      | 4662,78           | 2433,04      | 3317,74          | 2603,09      | 2779,73                    | 1331,12      |
| 7           | 2130,48           | 1658,21      | 8070,19           | 2034,08      | 8249,53          | 2079,86      | 5828,47                    | 1576,24      |
| 8           | 1310,38           | 1896,27      | 5021,45           | 2276,07      | 4483,44          | 3021,68      | 5200,79                    | 1517,38      |
| 9           | 722,05            | 2712,72      | 9684,23           | 967,98*      | 6545,82          | 2387,26      | 1255,36                    | 2066,78      |
| 10          | 1256,92           | 1971,35      | †                 | †            | 7442,51          | 2688,12      | 1793,38                    | 1347,33      |
| <b>X±SD</b> | 1313,9±401,3      | 2112,2±420,3 | 6306,7±1912,7     | 2192,9±397,4 | 5613,2±1749,1    | 2392,5±452,4 | 4591,0±2656,2              | 1647,8±541,9 |

\* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

|                 |         |         |          |          |          |          |          |         |
|-----------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|
| <b>Q1</b>       | 1060,78 | 1748,50 | 4752,45  | 2106,025 | 4079,93  | 2135,458 | 2039,97  | 1335,17 |
| <b>Q3</b>       | 1508,72 | 2374,44 | 7532,18  | 2354,555 | 6747,58  | 2666,86  | 6926,91  | 1944,15 |
| <b>DJ</b>       | 447,94  | 625,93  | 2779,73  | 248,53   | 2667,64  | 531,41   | 4886,94  | 608,97  |
| <b>3/2DJ</b>    | 671,91  | 938,90  | 4169,59  | 372,795  | 4001,47  | 797,12   | 7330,42  | 913,46  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 388,88  | 809,60  | 582,85   | 1733,23  | 78,46    | 1338,34  | -5290,45 | 421,71  |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 2180,63 | 3313,34 | 11701,77 | 2727,35  | 10749,04 | 3463,98  | 14257,33 | 2857,61 |
| <b>Mín.</b>     | 722,05  | 1659,21 | 3945,43  | 1451,98  | 3317,74  | 1484,68  | 896,69   | 1026,92 |
| <b>Máx.</b>     | 2130,48 | 2803,02 | 9684,23  | 2746,98  | 8249,53  | 3021,68  | 7621,85  | 2570,39 |

**Apêndice 14:** Valores de MDA (nmol/mL) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 7 dias de infecção.

| Animal      | Controle Negativo |              | Controle Positivo |               | N-acetilcisteína |              | <i>Agaricus sylvaticus</i> |              |
|-------------|-------------------|--------------|-------------------|---------------|------------------|--------------|----------------------------|--------------|
|             | MDA (P)           | MDA (C)      | MDA (P)           | MDA (C)       | MDA (P)          | MDA (C)      | MDA (P)                    | MDA (C)      |
| 1           | 1060,79           | 2429,85      | 2779,73           | 2020,99       | 5738,8           | 2433,04      | 4483,44                    | 1314,63      |
| 2           | 1328,21           | 2241,04      | 1451,43           | 3132,87       | 6276,81          | 3211,36      | 5559,46                    | 2550,77      |
| 3           | 2164,19           | 1822,39      | 2331,39           | 155,45        | 14888,8*         | 2707,74      | 1972,71                    | 3178,65      |
| 4           | 1702,61           | 1674,63      | 6545,82           | 1962,13       | 4842,11          | 3034,76      | 3676,42                    | 2988,98      |
| 5           | 1149,93           | 1674,63      | 8877,21           | 3257,14       | 3855,76          | 3701,89      | 5111,12                    | 3412,26      |
| 6           | 1337,12           | 3767,79*     | 2600,39           | 2884,33       | 4752,45          | 1268,84*     | 4214,43                    | 1870,57      |
| 7           | 1952,21           | 1937,31      | 4483,44           | 1406,19       | 4483,44          | 2753,52      | 4573,11                    | 3026,80      |
| 8           | 1408,44           | 2454,48      | †                 | †             | 3497,08          | 2642,34      | 3407,41                    | 3250,60      |
| 9           | 1114,27           | 2462,69      | †                 | †             | †                | †            | †                          | †            |
| 10          | 811,19            | 2643,28      | †                 | †             | †                | †            | †                          | †            |
| <b>X±SD</b> | 1402,9±421,0      | 2148,9±375,0 | 4152,8±2679,1     | 2117,0±1103,5 | 4778,1±979,1     | 2926,4±427,4 | 4124,7±1115,8              | 2699,2±742,5 |

\* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

|                 |         |         |          |         |         |         |         |         |
|-----------------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <b>Q1</b>       | 1123,18 | 1822,39 | 2465,89  | 1684,16 | 4169,60 | 2675,04 | 3609,17 | 2380,72 |
| <b>Q3</b>       | 1629,07 | 2454,48 | 5514,63  | 3008,60 | 5290,45 | 3123,06 | 4707,61 | 3196,64 |
| <b>DJ</b>       | 505,88  | 632,09  | 3048,74  | 1324,44 | 1120,85 | 448,02  | 1098,44 | 815,92  |
| <b>3/2DJ</b>    | 758,82  | 948,13  | 4573,11  | 1986,66 | 1681,28 | 672,03  | 1647,67 | 1223,88 |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 364,36  | 874,25  | -2107,22 | -302,49 | 2488,32 | 2003,01 | 1961,50 | 1156,84 |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 2387,89 | 3402,61 | 10087,74 | 4995,26 | 6971,74 | 3795,09 | 6355,28 | 4420,52 |
| <b>Min.</b>     | 811,19  | 1674,63 | 1451,43  | 155,45  | 3497,08 | 2433,04 | 1972,71 | 1314,63 |
| <b>Max.</b>     | 2164,19 | 2643,28 | 8877,21  | 3257,14 | 6276,81 | 3701,89 | 5559,46 | 3412,26 |

**Apêndice 15:** Valores de MDA (nmol/mL) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 10 dias de infecção.

| Animal      | Controle Negativo |              | Controle Positivo |              | N-acetilcisteína |              | <i>Agaricus sylvaticus</i> |               |
|-------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|------------------|--------------|----------------------------|---------------|
|             | MDA (P)           | MDA (C)      | MDA (P)           | MDA (C)      | MDA (P)          | MDA (C)      | MDA (P)                    | MDA (C)       |
| 1           | 1089,14           | 1559,70      | 5111,12           | 1864,03      | 4483,44          | 2348,02      | 2779,73                    | 1497,76       |
| 2           | 854,33            | 2561,19      | 5290,46           | 2289,15      | 6545,82          | 2243,37      | 3676,42                    | 1478,14       |
| 3           | 1453,01           | 3316,42      | 3945,42           | 2007,91      | 4124,76          | 2668,50      | 3048,74                    | 1419,28       |
| 4           | 1602,94           | 1206,72      | 4393,77           | 1543,54      | 6725,16          | 1949,05      | 5380,13                    | 3499,14       |
| 5           | 198,06*           | 1732,09      | 6635,49           | 3211,36      | 8070,19          | 4022,37      | 8879,40*                   | 3597,24       |
| 6           | 1488,66           | 1206,72      | 8431,0*           | 2962,82      | 8787,54          | 3093,63      | †                          | †             |
| 7           | 1221,24           | 1017,91      | 4931,78           | 3270,22      | †                | †            | †                          | †             |
| 8           | 1426,27           | 1387,31      | †                 | †            | †                | †            | †                          | †             |
| 9           | 1194,49           | 2947,09      | †                 | †            | †                | †            | †                          | †             |
| 10          | 1301,47           | 2364,18      | †                 | †            | †                | †            | †                          | †             |
| <b>X±SD</b> | 1292,4±230,9      | 1929,9±809,1 | 5051,3±920,9      | 2449,9±695,4 | 6456,1±1868,0    | 2720,8±748,1 | 3721,2±1168,0              | 2298,3±1141,9 |

\* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

|                 |         |         |         |         |          |         |         |          |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|----------|
| <b>Q1</b>       | 1194,49 | 1251,86 | 4528,27 | 1935,97 | 4999,03  | 2269,53 | 2981,49 | 1478,14  |
| <b>Q3</b>       | 1453,01 | 2511,94 | 5245,62 | 3087,09 | 7733,93  | 2987,35 | 4102,35 | 3499,14  |
| <b>DJ</b>       | 258,52  | 1260,07 | 717,352 | 1151,12 | 2734,89  | 717,81  | 1120,86 | 2020,99  |
| <b>3/2DJ</b>    | 387,78  | 1890,11 | 1076,03 | 1726,68 | 4102,35  | 1076,72 | 1681,29 | 3031,49  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 806,71  | -638,24 | 3452,24 | 209,29  | 896,69   | 1192,81 | 1300,20 | -1553,35 |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 1840,79 | 4402,05 | 6321,65 | 4813,77 | 11836,28 | 4064,07 | 5783,64 | 6530,63  |
| <b>Min.</b>     | 854,33  | 1017,91 | 3945,42 | 1543,54 | 4124,76  | 1949,05 | 2779,73 | 1419,28  |
| <b>Max.</b>     | 1602,94 | 3316,42 | 6635,49 | 3270,22 | 8787,54  | 4022,37 | 5380,13 | 3597,24  |

**Apêndice 16:** Valores de NO ( $\mu\text{mol/L}$ ) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 1 dia de infecção.

| Animal                     | Controle Negativo |                   | Controle Positivo   |                   | N-acetilcisteína    |                    | <i>Agaricus sylvaticus</i> |                    |
|----------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
|                            | NO (P)            | NO (C)            | NO (P)              | NO (C)            | NO (P)              | NO (C)             | NO (P)                     | NO (C)             |
| 1                          | 1064,63           | 559,43            | 2103,78             | 645,4             | 245,40              | 1121,08            | 1548,11                    | 1423,78            |
| 2                          | 683,83            | 918,47            | 7575,67*            | 915,67            | 968,1               | 796,75             | 1926,48                    | 1531,89            |
| 3                          | 1263,28           | 527,11            | 4478,67             | 2369,73*          | 1174,59             | 1667,03            | 1531,89                    | 1488,64            |
| 4                          | 898,03            | 869,19            | 1794,05             | 1088,65           | 555,13              | 1169,73            | 1412,97                    | 1099,45            |
| 5                          | 874,23            | 425,67            | 3549,18             | 2948,11*          | 1174,59             | 1488,64            | 636,12                     | 1207,56            |
| 6                          | 862,33            | 728,39            | 2723,24             | 494,05            | 1277,83             | 2261,62            | 807,57                     | 1099,45            |
| 7                          | 1076,53           | 1246,45           | 3239,45             | 526,48            | 1690,81             | 1180,54            | 1775,13                    | 1315,67            |
| 8                          | 1052,73           | 425,67            | 22070,02*           | 688,65            | 5820,54             | 2223,78            | 1294,05                    | 1321,08            |
| 9                          | 794,05            | 650,95            | 2103,78             | 1299,46           | 5510,81             | 1207,56            | 488,65                     | 1185,94            |
| 10                         | SD                | SD                | 245,4               | 553,51            | 6749,72             | 1310,27            | 942,7                      | 1218,37            |
| <b>X<math>\pm</math>SD</b> | 952,2 $\pm$ 176,4 | 705,7 $\pm$ 268,8 | 2529,7 $\pm$ 1281,8 | 776,5 $\pm$ 294,5 | 2516,7 $\pm$ 2472,6 | 1442,7 $\pm$ 479,6 | 1236,4 $\pm$ 491,6         | 1289,2 $\pm$ 153,8 |

\* = Pontos excluídos; †= animais falecidos; SD=Sem dosagem.

|                 |         |         |         |         |          |         |         |         |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|
| <b>Q1</b>       | 862,33  | 527,11  | 2026,35 | 546,75  | 1019,72  | 1172,43 | 841,35  | 1191,34 |
| <b>Q3</b>       | 1064,63 | 869,19  | 3316,88 | 958,91  | 4555,81  | 1622,43 | 1544,05 | 1398,10 |
| <b>DJ</b>       | 202,3   | 342,08  | 1290,53 | 412,16  | 3536,09  | 450     | 702,70  | 206,76  |
| <b>3/2DJ</b>    | 303,45  | 513,12  | 1935,80 | 618,24  | 5304,13  | 675     | 1054,05 | 310,14  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 558,88  | 13,99   | 90,54   | -71,49  | -4284,41 | 497,43  | -212,70 | 881,20  |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 1368,08 | 1382,31 | 5252,68 | 1577,16 | 9859,94  | 2297,43 | 2598,11 | 1708,24 |
| <b>Min.</b>     | 683,83  | 425,67  | 245,4   | 494,05  | 245,40   | 796,75  | 488,65  | 1099,45 |
| <b>Max.</b>     | 1263,28 | 1246,45 | 4478,67 | 1299,46 | 6749,72  | 2261,62 | 1926,48 | 1531,89 |

**Apêndice 17:** Valores de NO ( $\mu\text{mol/L}$ ) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 3 dias de infecção.

| Animal                     | Controle Negativo |                   | Controle Positivo   |                  | N-acetilcisteína    |                    | <i>Agaricus sylvaticus</i> |                   |
|----------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------|---------------------|--------------------|----------------------------|-------------------|
|                            | NO (P)            | NO (C)            | NO (P)              | NO (C)           | NO (P)              | NO (C)             | NO (P)                     | NO (C)            |
| 1                          | 767,95            | 798,79            | 3032,97             | 629,19           | 8504,86*            | 1148,11            | 1640                       | 1180,54           |
| 2                          | 493,43            | 826,95            | 658,37              | 531,89           | 348,64              | 1596,75            | 406,66                     | 1121,08           |
| 3                          | 525,13            | 566,47            | 658,37              | 650,81           | 4788,1              | 1342,7             | 661,62                     | 1126,48           |
| 4                          | 1122,23*          | 684,53            | 1381,08             | 1445,4*          | 3858,91             | 964,32             | 548,11                     | 1012,97           |
| 5                          | 564,83            | 848,06            | 245,4               | 607,56           | 4375,13             | 1153,51            | 1612,97                    | 1099,45           |
| 6                          | 588,63            | 503,11            | 1174,59             | 429,13*          | 4478,37             | 942,7              | 883,24                     | 1121,08           |
| 7                          | 862,63            | 615,75            | 3652,43             | 607,56           | 3136,21             | 1748,11            | 1083,24                    | 1440,00*          |
| 8                          | 576,73            | 348,23            | 555,13              | 1299,46*         | 2413,51             | 1250,81            | 1250,81                    | 1061,62           |
| 9                          | 645,67            | 460,86            | 3239,45             | 575,13           | 11395,67*           | 1585,94            | 402,16                     | 1034,59           |
| 10                         | SD                | SD                | 4478,37             | 553,51           | 245,4               | 3634,59*           | 910,27                     | 2483,24*          |
| <b>X<math>\pm</math>SD</b> | 628,1 $\pm$ 126,4 | 628,1 $\pm$ 175,4 | 1907,6 $\pm$ 1535,5 | 593,7 $\pm$ 42,2 | 2955,5 $\pm$ 1811,7 | 1303,7 $\pm$ 287,1 | 939,9 $\pm$ 455,7          | 1094,7 $\pm$ 55,0 |

\* = Pontos excluídos; † = animais falecidos; SD=Sem dosagem.

|                 |        |         |          |          |          |         |         |           |
|-----------------|--------|---------|----------|----------|----------|---------|---------|-----------|
| <b>Q1</b>       | 554,90 | 503,11  | 658,37   | 564,32   | 1897,29  | 1148,11 | 576,49  | 1054,8625 |
| <b>Q3</b>       | 676,24 | 798,79  | 3187,83  | 618,375  | 4400,94  | 1585,94 | 1208,92 | 1122,43   |
| <b>DJ</b>       | 121,33 | 295,68  | 2529,46  | 54,055   | 2503,65  | 437,83  | 632,43  | 67,5675   |
| <b>3/2DJ</b>    | 182,00 | 443,52  | 3794,19  | 81,0825  | 3755,47  | 656,74  | 948,64  | 101,35125 |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 372,90 | 59,59   | -3135,82 | 483,2375 | -1858,18 | 491,36  | -372,16 | 953,51125 |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 858,24 | 1242,31 | 6982,02  | 699,4575 | 8156,41  | 2242,68 | 2157,56 | 1223,7813 |
| <b>Min.</b>     | 493,43 | 348,23  | 245,4    | 531,89   | 245,4    | 942,7   | 402,16  | 1012,97   |
| <b>Max.</b>     | 862,63 | 848,06  | 4478,37  | 650,81   | 4788,1   | 1748,11 | 1640,0  | 1180,54   |

**Apêndice 18:** Valores de NO ( $\mu\text{mol/L}$ ) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 5 dias de infecção.

| Animal                     | Controle Negativo |                   | Controle Positivo   |                   | N-acetilcisteína    |                    | <i>Agaricus sylvaticus</i> |                  |
|----------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|--------------------|----------------------------|------------------|
|                            | NO (P)            | NO (C)            | NO (P)              | NO (C)            | NO (P)              | NO (C)             | NO (P)                     | NO (C)           |
| 1                          | 433,93            | 1052,24           | 8195,13             | 618,38            | 11498,91            | 1688,64            | 590                        | 1234,59*         |
| 2                          | 898,03            | 277,83            | 245,4               | 521,08            | 13047,56            | 1710,27            | 373,33                     | 1056,21          |
| 3                          | 564,83            | 1070,03           | 5717,29             | 596,75            | 6956,21             | 1461,62            | 740                        | 1029,19          |
| 4                          | 1350,23           | 1073,35           | 8711,35             | 521,08            | 12944,32            | 1558,92            | 1228,88                    | 964,32           |
| 5                          | 850,43            | 770,64            | 4168,64             | 726,48            | 2826,48             | 1137,30            | 2395,55*                   | 741,08*          |
| 6                          | 874,05            | 953,68            | 864,86              | 1261,62           | 5717,29             | 1385,94            | 501,11                     | 841,62           |
| 7                          | 1374,03           | 305,99            | 2103,78             | 1883,24           | 22649,18*           | 1645,5             | 701,11                     | 937,3            |
| 8                          | 862,15            | 439,75            | 3032,97             | 542,7             | 11189,18            | 1072,43            | 1295,55                    | 1029,19          |
| 9                          | 303,03            | 1094,47           | 9434,05             | 1083,24           | 11705,4             | 1845,4             | 573,33                     | 1207,56*         |
| 10                         | SD                | SD                | SD                  | SD                | 4271,89             | 1510,27            | 306,66                     | 964,32           |
| <b>X<math>\pm</math>SD</b> | 834,5 $\pm$ 367,3 | 782,0 $\pm$ 374,5 | 4719,3 $\pm$ 3465,9 | 861,6 $\pm$ 465,6 | 8906,4 $\pm$ 3962,9 | 1501,6 $\pm$ 247,8 | 701,1 $\pm$ 382,3          | 977,4 $\pm$ 67,0 |

\* = Pontos excluídos; † = animais falecidos; SD = Sem dosagem.

|                 |         |         |          |         |          |         |         |         |
|-----------------|---------|---------|----------|---------|----------|---------|---------|---------|
| <b>Q1</b>       | 564,83  | 439,75  | 2103,78  | 542,7   | 5717,29  | 1404,86 | 501,11  | 950,81  |
| <b>Q3</b>       | 898,03  | 1070,03 | 8195,13  | 1083,24 | 11705,4  | 1677,85 | 740     | 1029,19 |
| <b>DJ</b>       | 333,2   | 630,28  | 6091,35  | 540,54  | 5988,11  | 272,99  | 238,89  | 78,38   |
| <b>3/2DJ</b>    | 499,8   | 945,42  | 9137,02  | 810,81  | 8982,16  | 409,49  | 358,33  | 117,57  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 65,03   | -505,67 | -7033,24 | -268,11 | -3264,87 | 995,37  | 142,77  | 833,24  |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 1397,83 | 2015,45 | 17332,15 | 1894,05 | 20687,56 | 2087,35 | 1298,33 | 1146,76 |
| <b>Min.</b>     | 303,03  | 277,83  | 245,4    | 521,08  | 2826,48  | 1072,43 | 306,66  | 841,62  |
| <b>Max.</b>     | 1374,03 | 1094,47 | 9434,05  | 1261,62 | 13047,56 | 1845,4  | 1295,55 | 1056,21 |

**Apêndice 19:** Valores de NO ( $\mu\text{mol/L}$ ) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 7 dias de infecção.

| Animal                     | Controle Negativo |                   | Controle Positivo   |                   | N-acetilcisteína    |                    | <i>Agaricus sylvaticus</i> |                    |
|----------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
|                            | NO (P)            | NO (C)            | NO (P)              | NO (C)            | NO (P)              | NO (C)             | NO (P)                     | NO (C)             |
| 1                          | 683,65            | 728,39            | 5614,05             | 753,51            | 14080,0*            | 2331,89            | 784,44                     | 832,59             |
| 2                          | 845,83            | 510,15            | 1794,05             | 445,4             | 6543,24             | 1456,21            | 3540,0*                    | 1223,78            |
| 3                          | 719,55            | 883,27            | 658,37              | 440,00            | 24619,81*           | 1207,57            | 917,77                     | 1202,16            |
| 4                          | 557,81            | 517,01            | 2516,75             | 685,94            | 6543,24             | 1737,3             | 540,00                     | 996,75             |
| 5                          | 576,73            | 748,17            | 11164,76*           | 699,45            | 5820,54             | 1537,3             | 606,66                     | 948,11             |
| 6                          | 591,07            | 819,91            | 1794,05             | 510,27            | 8711,35             | 1218,38            | 651,11                     | 818,37             |
| 7                          | 600,84            | 327,11            | 1897,29             | 802,16            | 9227,56             | 1888,65            | 595,55                     | 969,73             |
| 8                          | 1052,73*          | 1101,51           | †                   | †                 | 1794,05*            | 2553,51            | 440,00                     | 1261,62            |
| 9                          | 731,25            | 840,93            | †                   | †                 | †                   | †                  | †                          | †                  |
| 10                         | SD                | SD                | †                   | †                 | †                   | †                  | †                          | †                  |
| <b>X<math>\pm</math>SD</b> | 663,3 $\pm$ 99,4  | 719,6 $\pm$ 233,8 | 2379,1 $\pm$ 1694,8 | 619,5 $\pm$ 150,9 | 7369,2 $\pm$ 1501,5 | 1741,3 $\pm$ 494,4 | 647,9 $\pm$ 158,5          | 1031,6 $\pm$ 175,7 |

\* = Pontos excluídos; †= animais falecidos; SD=Sem dosagem.

|                 |        |         |         |         |          |         |        |         |
|-----------------|--------|---------|---------|---------|----------|---------|--------|---------|
| <b>Q1</b>       | 587,48 | 517,01  | 1794,05 | 477,83  | 6543,24  | 1396,75 | 567,77 | 919,23  |
| <b>Q3</b>       | 722,47 | 840,93  | 2361,88 | 726,48  | 8711,35  | 1999,46 | 717,77 | 1207,56 |
| <b>DJ</b>       | 134,99 | 323,92  | 567,83  | 248,64  | 2168,11  | 602,71  | 150    | 288,33  |
| <b>3/2DJ</b>    | 202,48 | 485,88  | 851,75  | 372,97  | 3252,16  | 904,06  | 225    | 432,50  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 385,0  | 31,13   | 942,30  | 104,87  | 3291,07  | 492,69  | 342,77 | 486,73  |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 924,96 | 1326,81 | 3213,64 | 1099,45 | 11963,51 | 2903,52 | 942,77 | 1640,07 |
| <b>Min.</b>     | 557,81 | 327,11  | 658,37  | 440,0   | 5820,54  | 1207,57 | 440    | 818,37  |
| <b>Max.</b>     | 845,83 | 1101,51 | 2516,75 | 802,16  | 9227,56  | 2553,51 | 917,77 | 1261,62 |

**Apêndice 20:** Valores de NO ( $\mu\text{mol/L}$ ) nos tecidos pulmonar (P) e cerebral (C) para cada animal em 10 dias de infecção.

| Animal                     | Controle Negativo |                   | Controle Positivo   |                   | N-acetilcisteína     |                   | <i>Agaricus sylvaticus</i> |                   |
|----------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|
|                            | NO (P)            | NO (C)            | NO (P)              | NO (C)            | NO (P)               | NO (C)            | NO (P)                     | NO (C)            |
| 1                          | 731,26            | 665,03            | 2826,48             | 483,24            | 3962,16              | 1304,86           | 406,66                     | 1056,21           |
| 2                          | 576,74            | 815,19            | 3239,45             | 791,35            | 18725,94             | 1391,35           | 734,44                     | 877,83            |
| 3                          | 1374,03           | 622,8             | 2000,54             | 429,19            | 4375,13              | 1564,32           | 440                        | 867,03            |
| 4                          | 826,65            | 672,07            | 4065,4              | 694,05            | 7678,91              | 1418,38           | 673,33                     | 1126,48           |
| 5                          | 1088,37           | 862,15            | 5407,56             | 488,64            | 22132,97             | 1856,22*          | 784,44                     | 1661,62*          |
| 6                          | 374,43            | 467,91            | 7369,18             | 1153,51           | 23165,4              | 1467,03           | †                          | †                 |
| 7                          | 993,23            | 425,66            | 6027,02             | 748,11            | †                    | †                 | †                          | †                 |
| 8                          | 1195,54           | 636,87            | †                   | †                 | †                    | †                 | †                          | †                 |
| 9                          | 993,23            | 900,88            | †                   | †                 | †                    | †                 | †                          | †                 |
| 10                         | SD                | SD                | †                   | †                 | †                    | †                 | †                          | †                 |
| <b>X<math>\pm</math>SD</b> | 905,9 $\pm$ 312,1 | 674,3 $\pm$ 163,9 | 4419,4 $\pm$ 1922,1 | 684,0 $\pm$ 251,5 | 13340,1 $\pm$ 8980,2 | 1429,2 $\pm$ 95,8 | 607,8 $\pm$ 173,3          | 981,9 $\pm$ 129,7 |

\* = Pontos excluídos; †= animais falecidos; SD=Sem dosagem.

|                 |         |         |         |         |           |         |        |         |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|-----------|---------|--------|---------|
| <b>Q1</b>       | 731,26  | 622,8   | 3032,96 | 485,94  | 5201,07   | 1391,35 | 440,0  | 875,13  |
| <b>Q3</b>       | 1088,37 | 815,19  | 5717,29 | 769,73  | 21281,21  | 1467,03 | 734,44 | 1073,78 |
| <b>DJ</b>       | 357,11  | 192,39  | 2684,32 | 283,79  | 16080,14  | 75,68   | 294,44 | 198,65  |
| <b>3/2DJ</b>    | 535,66  | 288,58  | 4026,49 | 425,68  | 24120,21  | 113,52  | 441,66 | 297,97  |
| <b>Q1-3/2DJ</b> | 195,59  | 334,21  | -993,52 | 60,25   | -18919,13 | 1277,83 | -1,66  | 577,16  |
| <b>Q3+3/2DJ</b> | 1624,03 | 1103,77 | 9743,78 | 1195,41 | 45401,42  | 1580,55 | 1176,1 | 1371,75 |
| <b>Min.</b>     | 576,74  | 425,66  | 2000,54 | 429,19  | 3962,16   | 1304,86 | 406,66 | 867,03  |
| <b>Max.</b>     | 1374,03 | 900,88  | 7369,18 | 1153,51 | 23165,4   | 1467,03 | 784,44 | 1126,48 |

## 10- ANEXOS

### ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO



#### **PARECER MED014/2008**

**Projeto:** ALTERAÇÕES OXIDATIVAS, DO ÓXIDO NÍTRICO E EXPRESSÃO DE CITOCINAS E GM-CSF, INDUZIDAS PELO *PLASMODIUM BERGHEI* EM CAMUNDONGOS.

**Coordenador:** Sandro Percário (NMT/UFPA)

**Vigência:** 06-03-2008 a 06-03-2011

O Projeto de Pesquisa intitulado “ALTERAÇÕES OXIDATIVAS, DO ÓXIDO NÍTRICO E EXPRESSÃO DE CITOCINAS E GM-CSF, INDUZIDAS PELO *PLASMODIUM BERGHEI* EM CAMUNDONGOS” foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) e os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para manipulação e uso de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das suas atribuições, resolve APROVAR a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora deste período devem receber nova autorização deste comitê. Ao CEPAE é facultado o direito de verificar *in loco* a correta aplicação do protocolo aprovado.



Prof. Dr. Antônio Pereira  
Presidente do CEPAE/UFPA

ANEXO B - COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO COGUMELO *Agaricus sylvaticus*.

| <b>Substância</b>       | <b>Concentração</b> |
|-------------------------|---------------------|
| Proteínas               | 39.4mg/100g         |
| Gorduras                | 3.0g/100g           |
| Carboidratos            | 45.6g/100g          |
| Sódio                   | 4.2mg/100g          |
| Ferro                   | 21.2mg/100g         |
| Cálcio                  | 35.7mg/100g         |
| Potássio                | 3.15g/100g          |
| Magnésio                | 100mg/100g          |
| Cobre                   | 8.24mg/100g         |
| Zinco                   | 6.61mg/100g         |
| Manganês                | 0.65mg/100g         |
| Selênio                 | 36µg/100g           |
| Tiamina (B1)            | 1.21mg/100g         |
| Riboflavina (B2)        | 3.41mg/100g         |
| Vitamina B6             | 0.83mg/100g         |
| Vitamina B12            | 0.17µg/100g         |
| Vitamina C              | 56mg/100g           |
| Calciferol              | 5.8µg/100g          |
| Ácido fólico            | 0.36mg/100g         |
| Ácido pantotênico       | 39.4mg/100g         |
| Inositol                | 201mg/100g          |
| Niacina                 | 39.9mg/100g         |
| Arginina                | 1.71g/100g          |
| Lisina                  | 1.55g/100g          |
| Histidina               | 0.62g/100g          |
| Fenilalanina            | 1.11g/100g          |
| Tirosina                | 0.83g/100g          |
| Leucina                 | 1.72g/100g          |
| Isoleucina              | 1.10g/100g          |
| Metionina               | 0.39g/100g          |
| Valina                  | 1.28g/100g          |
| Alanina                 | 1.75g/100g          |
| Glicina                 | 1.25g/100g          |
| Prolina                 | 1.26g/100g          |
| Ácido Glutâmico         | 5.73g/100g          |
| Serina                  | 1.20g/100g          |
| Treonina                | 1.21g/100g          |
| Ácido aspártico         | 2.35g/100g          |
| Triptofano              | 0.43g/100g          |
| Cistina                 | 0.36g/100g          |
| Açúcar Livre            | 282mg/g             |
| Fenóis                  | 0.10mg/g            |
| Beta D Glucana          | 126.98mg/g          |
| Isoflavona (Genisteina) | 0,875mg/g           |

Fonte: Laudo de análise fornecido pela empresa Cogumelo do Sol Agaricus do Brasil Com. Imp. & Exp. LTDA.