



LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA MOLECULAR
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

LAYSE MARTINS GAMA

MALÁRIA E MEDICINA POPULAR: EFEITO DA *Bertholletia excelsa* H.B.K.
(CASTANHA-DO-PARÁ) EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Plasmodium*
berghei

BELÉM

2013

LAYSE MARTINS GAMA

MALÁRIA E MEDICINA POPULAR: EFEITO DA *Bertholletia excelsa* H.B.K.
(CASTANHA-DO-PARÁ) EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Plasmodium*
berghei

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia
Celular, da Universidade Federal do Pará –
UFPA.

Orientador(a): Prof^a Maria Elena Crespo López

BELÉM

2013

LAYSE MARTINS GAMA

MALÁRIA E MEDICINA POPULAR: EFEITO DA *Bertholletia excelsa* H.B.K.
(CASTANHA-DO-PARÁ) EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Plasmodium*
berghei

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará – UFPA.

Orientador (a): Prof^a. Dra. Maria Elena Crespo López

Co-orientador (a): Prof^a Dra. Karen Renata Matos Oliveira

Data: 25 de Junho de 2013

Banca: _____

Prof^a. Dra. Maria Elena Crespo López.

Laboratório de Farmacologia Molecular

Prof.Dra. Vanessa Jóia de Melo

Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

Laboratório de Neuroendocrinologia

Prof. Dr. José Ricardo Vieira

Laboratório de Análises Clínicas

Dedico este trabalho a minha avó Maria Melo, por ser minha mediadora e ter visto portas e janelas abertas quando eu não via nada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser tão bondoso e fiel, tornando mais este objetivo alcançado.

A minha mãe, meu irmão e toda a família Martins, por todo o investimento, educação e o apoio incondicional.

A incansável e generosa, Dra. Maria Elena Crespo que, felizmente, escolhi como orientadora. Nem todas as palavras da língua portuguesa seriam suficientes para descrever minha gratidão. Obrigada pelo apoio, disposição e paciência. Obrigada por me orientar, agir com tanta prontidão nas dificuldades e não permitir que eu desistisse (ou morresse de fome).

Ao Laboratório de Neuroendocrinologia, especialmente ao Dr. Anderson Herculano e Dra. Karen Renata, pela ajuda e contribuição para a realização deste trabalho, seja através de discussões científicas ou empréstimos de café.

Ao Laboratório de Análises Clínicas, na pessoa do Dr. Ricardo Vieira, sempre muito prestativo e atencioso. Agradeço muito ao Técnico André, pela disponibilidade e boa vontade.

A banca avaliadora, Dra. Vanessa Jóia, por sugerir melhoras neste projeto e estar disponível mesmo no fim da gravidez. Ao muito querido Dr. Edmar Tavares, uma inspiração profissional que desde muito tem minha admiração, obrigada por todas as sugestões e correções.

Aos meus amados irmãos do Laboratório de Farmacologia Molecular. É uma honra poder trabalhar num ambiente tão agradável, construtivo e conviver com seres humanos maravilhosos como vocês.

Ao meu Yuri, por toda a paciência, amor, carinho e confiança. Por me trazer paz e um pouco de insanidade também. Obrigada por ter sido, muitas vezes, como uma família inteira. Muito obrigada por trazer a minha vida sogros, um cunhado, uma avó e amigos que hoje chamo de meus.

Aos meus queridos amigos, irmãos que escolhi. Especialmente minhas meninas de sempre: Bárbara, Liana, Patrícia, Maísa, Livia e Nathalia.

A Capes, pela bolsa de estudos.

RESUMO

A malária é um grave problema de saúde pública, especialmente para a região Amazônica. Entretanto, fatores como a resistência, dificuldade de acesso e toxicidade dos fármacos tradicionais reduzem a efetividade das drogas distribuídas pelo governo para controle da infecção. Assim, a população amazônica ainda usa os recursos naturais, como a *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Pará), para melhorar os aspectos clínicos causados pela doença. Entretanto, não existe comprovação científica do efeito desse fruto na malária. Assim, este trabalho avaliou o efeito do pré tratamento com Castanha-do-Pará em camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei*, por meio dos parâmetros a seguir: sobrevivência até a morte de todos os indivíduos, parasitemia e peso dos animais (no 3º, 7º, 10º, 16º e 18º dia pós-inoculação do parasita), e, no 10º de infecção, hemograma completo, peso do fígado e do baço e análise das enzimas hepáticas aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e γ -glutamilaminotransferase (GGT). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para avaliar a normalidade, seguido de Análise de Variância (ANOVA) de uma via ou teste t de Student, seguido do teste *post hoc* de Tukey. O acompanhamento dos animais parasitados mostrou uma sobrevivência em média de 13,9 dias, com perda de peso, aumento do tamanho dos órgãos, e alterações tanto do hemograma (diminuição do hematócrito, hemoglobina, hemácias totais e plaquetas e aumento dos leucócitos totais) como das enzimas hepáticas (aumento da AST e ALT e diminuição da GGT). Interessantemente, o pré tratamento de 11 dias com o fruto exerceu uma proteção significativa em relação a alguns dos parâmetros medidos como o aumento da sobrevivência dos animais para 14,8 dias, diminuição dos níveis de parasitemia e leucócitos totais, manutenção do peso dos animais por mais tempo e do peso do baço, bem como influenciou positivamente nas enzimas hepáticas ALT e GGT. Assim, estes dados já demonstram que a *B. excelsa* pode ser utilizada como um reforço nutritivo diante a infecção causada pelo *Plasmodium*.

Palavras Chave: Amazônia, Plantas medicinais, Castanha-do-Pará, *Bertholletia excelsa*, Malária, *P. berghei*.

SUMMARY

Malaria is a serious problem of public health, especially in Amazon region. However, factors such as drug resistance, difficult access and toxicity of traditional drugs reduce the effectiveness of treatment. Thus, Amazon population usually uses natural resources, such as Brazil nuts, to improve the clinical symptoms of malaria. However, there is no scientific evidence of the effect of this fruit in malaria. So, this study evaluated the effect of pretreatment with Brazil nuts in BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei* by analysing the following parameters: survival to death of all individuals, parasitemia and weight of the animals (in the 3rd, 7th, 10th, 16th and 18th day post-inoculation of the parasite), and, at the 10th of infection, complete hemogram, liver and spleen weight and analysis of hepatic aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and γ -glutamyltransferase (GGT). Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate normality, followed by analysis of variance (ANOVA) one-way test or Student t test, followed by Tukey *post hoc* test. Monitoring of parasitized animals showed a mean survival of 13.9 days, loss of weight, enlarged organs, and changes of both the hemogram (decrease in hematocrit, hemoglobin, red blood cells and platelets and increased of total leukocytes) as hepatic enzymes (increased AST and ALT and decreased GGT). Interestingly, pretreatment with the fruit of 11 days show a significant protection of animals survival (light increase), levels of parasitemia and total leukocytes (decreased), weight of the animal and weight of the spleen (maintenance for a longer time) and ALT and GGT (increase). Thus, these data supports the use of *B. excelsa* as a nutritional adjuvant on the treatment against the infection caused by *Plasmodium*.

Keywords: Amazonia, Medicinal plants, Brazil nuts, *Bertholletia excelsa*, Malaria, *P. berghei*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Alanina Aminotransferase
CD	Células Dendríticas
GGT	Gama GlutamilTransferase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN γ	Interferon Gama
K	Potássio
LFM	Laboratório de Farmacologia Molecular
Mg	Magnésio
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
Se	Selênio
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TGO	Transaminase Glutâmica Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmica Pirúvica
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do parasita da malária.

Figura 2: Mapa da prevalência e distribuição geográfica mundial dos casos clínicos de malária.

Figura 3: Distribuição geográfica da *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Pará) no Brasil.

Figura 4: *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Pará) e amêndoas.

Figura 5: Produção anual da *Bertholletia excelsa* no Brasil até 2009.

Figura 6: Extensão sanguínea de camundongo BALB/c infectado com *P. berghei*.

Figura 7: Porcentagem de sobrevivência dos animais infectados com *Plasmodium berghei*.

Figura 8: Acompanhamento do peso dos animais infectados com *Plasmodium berghei* e Controle.

Figura 9: Acompanhamento do peso dos animais dos grupos experimentais.

Figura 10: Acompanhamento da porcentagem de células parasitadas dos grupos infectados.

Figura 11: Contagem de plaquetas nos grupos experimentais no 10º dia pós inoculação.

Figura 12: Quantificação de hemácias totais nos grupos experimentais no 10º dia pós inoculação.

Figura 13: Quantificação de hemoglobina nos grupos experimentais no décimo dia pós inoculação

Figura 14: Porcentagem do hematócrito nos grupos experimentais no 10º dia pós inoculação.

Figura 15: Quantificação de leucócitos totais nos grupos experimentais no 10º dia pós inoculação.

Figura 16: Peso do fígado dos animais dos grupos experimentais.

Figura 17: Fotos representativas dos fígados retirados no décimo dia de infecção de animais dos grupos experimentais.

Figura 18: Peso do baço dos animais dos grupos experimentais.

Figura 19: Fotos representativas dos baços retirados de animais dos grupos experimentais no décimo dia de infecção.

Figura 20: Quantificação enzimática de Aspartato Aminotransferase nos grupos experimentais.

Figura 21: Dosagem enzimática de Alanina Aminotransferase nos grupos experimentais.

Figura 22: Medição da enzima Gama GT nos grupos experimentais.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Considerações Gerais	13
1.2	Ciclo Biológico do Parasita.....	14
1.3	Patologia.....	15
1.4	Incidência da malária	17
1.5	Modelo Animal de Malária	19
1.6	Tratamento da Malária	20
1.7	<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K. (Castanha-do-Pará)	22
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo Geral.....	27
3.2	Objetivos Específicos.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Animais e grupos experimentais	28
4.2	Estabelecimento do modelo animal de malária com <i>P. berghei</i> em camundongos	28
4.3	Tratamento com <i>Bertholletia excelsa</i> (Castanha-do-Pará).....	28
4.4	Análise da sobrevivência.....	29
4.5	Acompanhamento do estado corporal.....	29
4.6	Avaliação da parasitemia	29
4.7	Pesagem do fígado e baço.....	30
4.8	Punção cardíaca e obtenção de amostras sanguíneas	30
4.9	Avaliação dos parâmetros laboratoriais	31
4.9.1	Hemograma.....	31
4.9.2	Enzimas hepáticas no sangue: Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST) e γ - Glutamil Transferase (GGT).....	31
4.10	Análise estatística.....	33

5	RESULTADOS.....	34
5.1	Sobrevivência dos animais após infecção com <i>Plasmodium berguei</i>	34
5.2	Evolução do peso dos animais	35
5.3	Análise do nível de parasitemia	37
5.4	Avaliação de parâmetros hematológicos de rotina.....	38
5.4.1	Análise do nível de plaquetas.....	38
5.4.2	Análise do nível de hemácias totais	39
5.4.3	Análise do nível de hemoglobina	40
5.4.4	Avaliação do nível de hematócrito	41
5.4.5	Análise do nível de leucócitos totais	42
5.5	Avaliação do peso dos órgãos: Fígado e Baço	43
5.5.1	Peso do Fígado	43
5.5.2	Peso do Baço.....	45
5.6	Avaliação dos níveis sanguíneos de enzimas hepáticas	47
5.6.1	Nível de Aspartato Aminotransferase (AST).....	47
5.6.2	Nível de Alanina Aminotransferase (ALT).....	48
5.6.3	Nível de γ -GlutamilTransferase (GGT).....	49
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO.....	59
8	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A malária é uma doença infecto-parasitária frequente e de elevado índice de morbimortalidade. Achados arqueológicos em múmias apontam que essa infecção é tão antiga quanto a própria humanidade, entretanto só foi descrita por Hipócrates no século V a.c. (RETIEF F *et al.*, 2006; TUTEJA, 2007).

Em seres humanos, a infecção procede da transmissão dos agentes infecciosos, os protozoários do gênero *Plasmodium*, através da picada dos mosquitos da espécie *Anopheles darlingi*, que são os principais vetores de transmissão da doença (HUNT *et al.*, 2006; MIRABELLO L *et al.*, 2006).

São quatro as principais espécies de plasmódios que afetam a população humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale* (COURA *et al.*, 2006). Destes, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são mais comuns na América do Sul, estando 99,9% dos casos concentrados na Amazônia Legal. Destes, 90% da incidência se dá por *P. vivax* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Os sintomas mais característicos da doença são febre, calafrio e sudorese (paroxismo febril). Outros sintomas como mialgia, náuseas e vômitos são frequentemente destacados. Dependendo do tempo de incubação e da espécie de *Plasmodium* responsável pela infecção, os aspectos clínicos manifestam-se de forma diferente. A não intervenção pode facilmente evoluir para quadros mais graves, com falência de órgãos e malária cerebral, chegando a óbito (REY, 1992; GOOD *et al.*, 2005).

Dentre as quatro espécies capazes de infectar humanos, a espécie *P. falciparum* é a que promove manifestações clínicas mais intensas, podendo causar insuficiência renal aguda, anemia grave, hipoglicemia, edema pulmonar, acidose metabólica e malária cerebral (MILLER *et al.*, 2002). As outras formas, relativamente menos graves, apresentam sintomas como febre intermitente, sudorese, mal estar, vômitos e intensa debilidade física.

Outros fatores que também influenciam na evolução clínica do paciente envolvem o nível de parasitemia no sangue e a sua resposta imune. Em conjunto com a espécie de

plasmódio, são considerados fundamentais para o desenvolvimento dos quadros de malária severa (GOOD *et al.*, 2005).

1.2 Ciclo Biológico do Parasita

O ciclo de vida do *Plasmodium* é composto por uma fase assexuada, que se desenvolve em um hospedeiro vertebrado, podendo o homem atuar neste papel, e uma fase sexuada, que ocorre em um hospedeiro invertebrado (o mosquito *Anopheles*).

Os esporozoítos que parasitam o mosquito são a fase inicial da infecção no hospedeiro vertebrado. Transmitidos através da picada do mosquito fêmea, acessam os capilares sanguíneos, atingindo rapidamente a circulação sistêmica (AMINO *et al.*, 2007; EJIGIRI *et al.*, 2009).

Na corrente sanguínea humana, os esporozoítos iniciam a fase assexuada do ciclo, que consiste em duas etapas: a pré-eritrocítica e a eritrocítica (EJIGIRI *et al.*, 2009; HALDAR *et al.*, 2007).

A fase pré-eritrocítica é caracterizada pela migração dos esporozoítos para o fígado, penetrando os hepatócitos, por um mecanismo não muito bem compreendido, onde permanecem de 9 a 16 dias (MOTA *et al.*, 2001). Cada esporozoíto dá origem a milhares de merozoítos dentro do hepatócito. Essa etapa da infecção é geralmente assintomática.

No final do período pré-eritrocítico os hepatócitos se rompem, liberando os merozoítos para a corrente sanguínea. Estes então invadem os eritrócitos (hemácias), dando início a fase eritrocítica (HALDAR *et al.*, 2007; STURM *et al.*, 2006) (Figura 1).

Dentro dos eritrócitos, os merozoítos passam por três fases de desenvolvimento por reprodução assexuada, garantindo a progressão da infecção. Inicialmente o parasita se diferencia, assumindo uma forma de anel denominado trofozoíta jovem. A seguir diferencia-se novamente em trofozoíta maduro e, por fim, forma os esquizontes maduros. O rompimento dos esquizontes maduros, que acompanham o rompimento das hemácias, liberam cerca de 20 novos merozoítos aptos a invadir novos eritrócitos (HALDAR *et al.*, 2007; SILVIE *et al.*, 2008) (Figura 2).

Uma pequena proporção dos merozoítos liberados na ruptura, por um mecanismo ainda não muito esclarecido, não invadem os eritrócitos e eventualmente se diferenciam em micro e macrogametócitos (masculino e feminino, respectivamente), formas sexuadas infectantes para o mosquito *Anopheles darlingi* fêmea (TUTEJA, 2007).

Ao ingerir os gametócitos de hospedeiros vertebrados, o mosquito se infecta, dando início à fase sexuada do ciclo biológico do parasita. Os gametócitos se fundem no trato digestivo, resultando na formação do zigoto. Este se diferencia em oocistos, iniciando a esporogonia, que leva a formação dos esporozoítas. Esta última forma evolutiva migra para a glândula salivar do mosquito e serão inoculados no hospedeiro vertebrado no momento de sua alimentação (TUTEJA, 2007; BAKER *et al.*, 2010) (Figura 1).

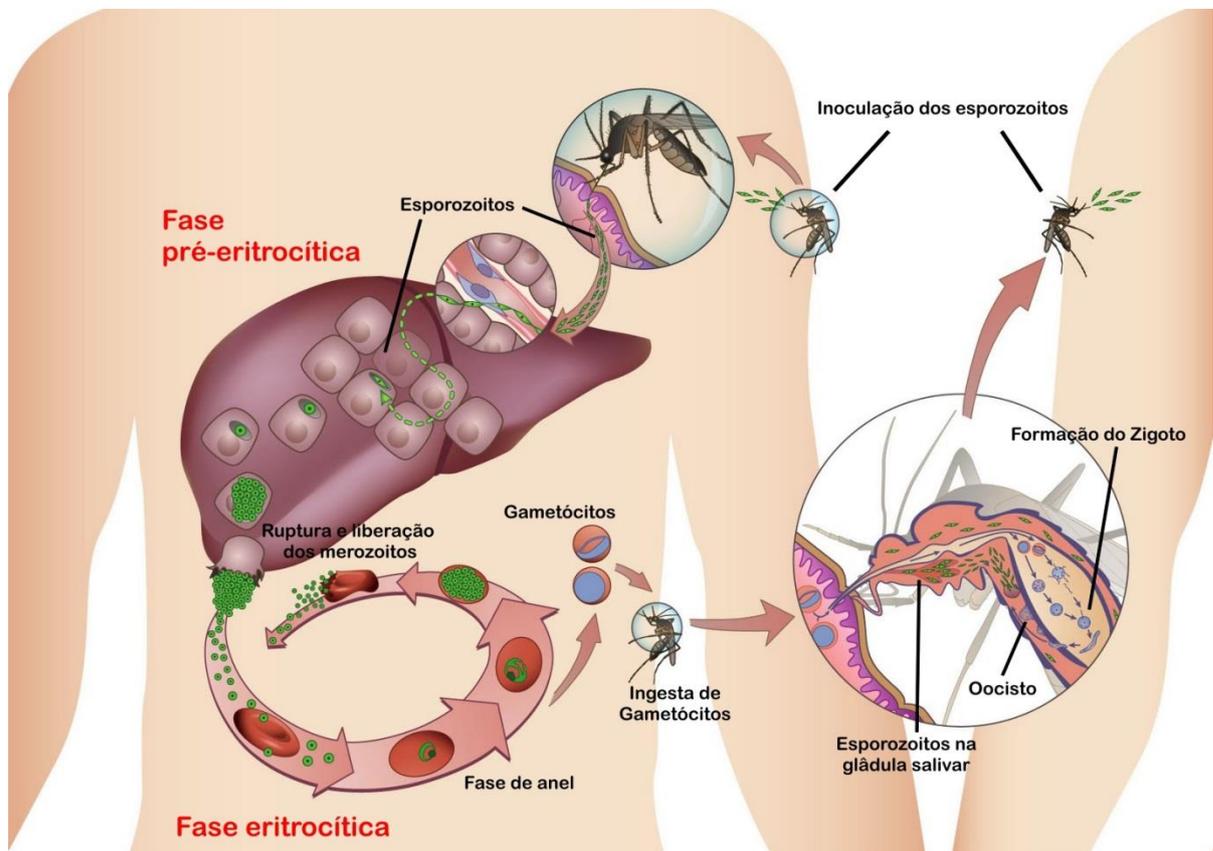


Figura 1: Ciclo de vida do parasita da malária. Adaptado de (Tuteja, 2007).

1.3 Patologia

A malária é uma doença sistêmica que altera a maioria dos órgãos. A gravidade pode variar desde manifestações benignas até graves e fatais. Fatores pessoais e características dos

parasitos influenciam na progressão e intensidade da infecção. Em geral, a anóxia tecidual é a principal atividade patogênica dos plasmódios no tecido, devido à redução da capacidade de transporte de O₂ no sangue (REY, 1992).

Perturbações do fluxo circulatório e aumento da glicólise anaeróbia também são descritos, somados a deficiência de oxigenação. A hipoglicemia ocorre nos pacientes como resultado do aumento da demanda de glicose, em face ao metabolismo anaeróbio do tecido e metabolismo dos parasitos, gerando menor suprimento para o paciente (CLARK *et al.*, 1997; BHALLA *et al.*, 2006).

Outra anormalidade fundamental para definir o diagnóstico de malária são as alterações das enzimas. As investigações bioquímicas das enzimas Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Fosfatase Alcalina e Gama Glutamiltransferase (GGT) são marcadores de atividades inflamatórias e intoxicações químicas, onde suas variações são parâmetros de disfunção no fígado, principalmente ALT. A hepatomegalia presente na doença também está associada às alterações enzimáticas (BHALLA *et al.*, 2006)

Em relação às alterações anatômicas e fisiopatológicas nos diversos órgãos e tecidos, o fígado, baço e principalmente o sangue sofrem modificações significativas. O fígado na fase aguda apresenta-se progressivamente aumentado e pigmentado. Com o avanço da doença, parasitos e hemácias fagocitadas são vistos no interior dos macrófagos e os hepatócitos apresentam alterações nucleares e infiltração gordurosa (REY, 1992; COTRAN, 2000).

O baço mostra-se dilatado e tenso, sujeito a ruptura traumática e podendo ultrapassar 1 kg. Não há alterações histológicas específicas, porém o tecido é repleto de hemácias parasitadas (COTRAN, 2000). No sangue, a destruição das hemácias corresponde à manifestação mais clara da doença. Existem várias suposições do mecanismo para evolução da condição anêmica da malária, dentre estas cabe ressaltar a capacidade dos macrófagos em fagocitar eritrócitos contendo os parasitos ou não, resultando na destruição de hemácias normais nesse processo auto-imune (REY, 1992).

O mecanismo de resistência ao parasito ainda é pouco compreendido, entretanto a imunidade foi observada em populações residentes em áreas hiperendêmicas, sujeitas a exposições repedidas a malária (FENG *et al.*, 2012). A aquisição da imunidade torna-se

dependente de vários fatores, dentre eles o sistema imunológico do hospedeiro e os mecanismos inflamatórios de resistência ao parasito (LANGHORNE, 2005).

Na resposta imune inflamatória a atividade das células CD4 em liberar IFN- γ , permite a ativação de macrófagos capazes de liberar o fator de necrose tumoral (TNF) e óxido nítrico (NO) que podem reduzir a parasitemia na fase inicial da infecção. Respostas inflamatórias do tipo Th1 também são capazes de controlar a parasitemia nessa fase (FENG, 2012).

As células dendríticas (CD) são igualmente importantes na imunidade inata, pois quando ativadas no baço, comportam-se como apresentadoras de antígenos, agindo como mediadora das respostas humoral e celular. Drogas imunomoduladoras das funções das CD contribuem para a imunidade contra os parasitas (FENG, 2012).

1.4 Incidência da malária

No contexto das endemias mundiais, a malária se posiciona como uma das doenças infecto-parasitárias com maiores taxas de morbimortalidade, assemelhando-se a outras doenças infecciosas como tuberculose e SIDA. Tal padrão a caracteriza como um grave problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (HUNT *et al.*, 2006; DOOLAN *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2009).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, o número de mortes por malária decaiu em 20% na última década. Mesmo assim, no ano de 2011, a doença foi responsável por 216 milhões de casos, que resultaram em 655.000 mortes, 91% destas no Continente Africano (WHO, 2011).

Embora o maior índice de casos se detenha ao continente africano, a disseminação da doença é uma realidade preocupante às autoridades. De acordo com a OMS, a doença apresenta distribuição significativa em regiões localizadas na América do Norte (México), América Central (Caribe), América do Sul (principalmente na região Amazônica), Ásia (Subcontinente Indiano, Sudeste Asiático e Oriente Médio), Europa Oriental e Oceania (WHO, 2009; WHO, 2010) (Figura 2).

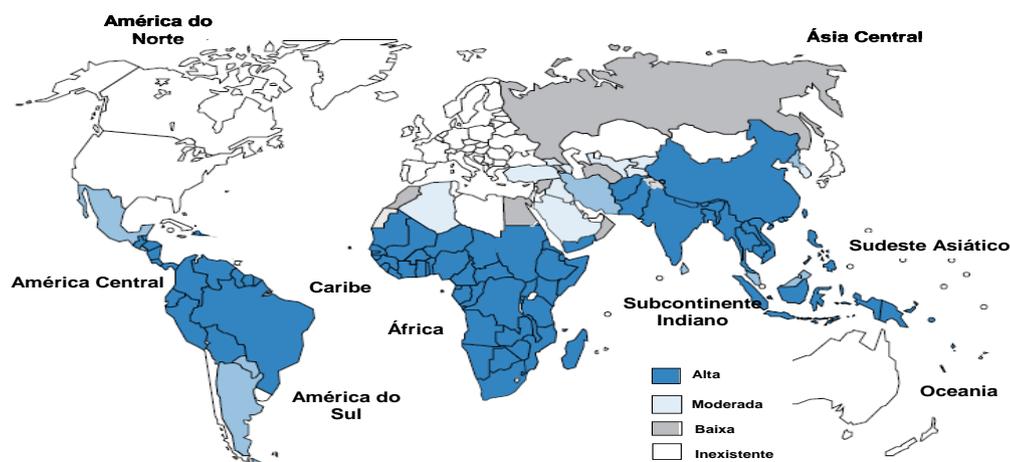


Figura 2: Mapa da prevalência e distribuição geográfica mundial dos casos clínicos de malária. Fonte: WHO, 2009; WHO, 2010.

No total, são 23 os países das Américas com casos confirmados. No Brasil, em 2010, foi reportado um total de 334.618 casos, sendo 283.384 por *P. vivax*, provocando 74 mortes (WHO, 2011). Em 2011, os dados epidemiológicos da região Amazônica mostraram incidência nos 9 estados, totalizando 263.323 casos, dos quais 43,09% (113.461 casos) localizados no Estado do Pará (SIVEP-MALÁRIA, 2012) (Tabela 1).

Unidade Federativa	Total de Casos			
	2010 Nº	%	2011 Nº	%
AM	74.135	22,23	59.279	22,51
PA	135.246	40,57	113.461	43,09
RO	43.576	13,07	30.371	11,53
AC	36.905	11,07	22.584	8,58
AP	15.388	4,62	18.437	7,00
RR	21.806	6,54	13.982	5,31
MT	2.365	0,70	1.630	0,62
MA	3.904	1,17	3.503	1,33
TO	104	0,03	76	0,02
AMAZÔNIA	333.429	100	263.323	100

Tabela 1 - Casos de Malária na Amazônia Legal (2010-2011) – Adaptada (Fonte: BRASIL, 2012)

Diversas estratégias de detenção da doença vêm sendo propostas por organizações internacionais. No Brasil foi implementado, a partir do ano 2000, o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), que resultou em reduções expressivas dos casos de malária na região amazônica (BRASIL, 2012).

Há de se ressaltar, no entanto, que apesar das políticas públicas impactarem na diminuição progressiva de casos, a doença ainda permanece afligindo populações mais carentes, uma vez que outros fatores, como a migração de indivíduos para as áreas endêmicas, difícil acesso ao tratamento e ausência de uma vacina eficaz, impedem a contenção e erradicação da doença.

1.5 Modelo Animal de Malária

Perante a necessidade de ampliar os estudos sobre a malária, na década de 1970 foram propostos modelos utilizando roedores, uma vez que quatro espécies de *Plasmodium* infectam esses animais, a saber: *P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. vinckei* e *P. berghei*. Cada espécie de parasita afeta uma linhagem diferente de roedor, manifestando sensibilidade e alterações patológicas respectivas a cada parasito (LAMB *et al.*, 2006) (Tabela 2).

Os modelos experimentais de malária evidenciam informações importantes no que diz respeito aos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da infecção (LANGHORNE, 2005).

Espécie do <i>Plasmodium</i>	Linhagens afetadas	Letalidade
<i>P. berghei</i>	BALB/c, C57Bl/6, CBA	Letais
<i>P. yoeliiyoelii 17X</i>	BALB/c	Não letal
<i>P. yoeliiyoelii 17XL</i>	C57Bl/6, BALB/c, CBA, DBA, Swiss	Letais
<i>P. chabaudichabaudi AS</i>	C57Bl/6	Não letal
<i>P. chabaudiadami DS</i>	C57Bl/6, C3H	Não letal, Letal
<i>P. chabaudiadami DK</i>	BALB/c, C3H	Não letais
<i>P. vinckevinckei</i>	BALB/c	Letal

Tabela 2: Modelos animais de malária. Adaptado de LAMB *et al.* (2006).

O *P. berghei* se caracteriza por sua capacidade de infectar camundongos da linhagem BALB/c, desenvolvendo um ciclo biológico equivalente às espécies que infectam humanos. O modelo experimental murino é muito bem definido nas pesquisas científicas, manifestando sintomas clínicos, patológicos e mecanismos imunológicos equivalentes aos manifestados na malária humana (LAMB *et al.*, 2006).

Apesar de serem resistentes à manifestação mais agressiva da malária, os animais BALB/c infectados apresentam destruição das hemácias, indução pró-inflamatória e anemia severa, garantindo que este modelo reproduz os aspectos mais característicos da malária humana (LAMB *et al.*, 2006).

1.6 Tratamento da Malária

O Ministério da Saúde do Brasil, através de uma política nacional antimalárica, orienta a terapêutica e distribui os medicamentos em unidades do Sistema Único de Saúde (SUS).

O tratamento medicamentoso objetiva atingir o parasito em pontos chave do ciclo evolutivo, agindo de forma específica sobre o plasmódio infectante. Os esquemas terapêuticos são diretamente influenciados por fatores como: idade do paciente, história de exposição, condições associadas (gravidez e outros problemas) e gravidade da doença (BRASIL, 2010).

A classificação dos medicamentos em relação à eliminação do parasito é dividida em três categorias. Os medicamentos que eliminam as formas hepáticas (em desenvolvimento ou dormentes) são chamados esquizonticidas tissulares; os que agem nos parasitos eritrocíticos são chamados esquizonticidas sanguíneos e, finalmente, os que agem nos estágios sexuais e são chamados gametocidas (KATZUNG, 2008)

As infecções em geral, são tratadas pela combinação de comprimidos de cloroquina e primaquina. A utilização de outros fármacos é aplicada conforme perfil do paciente e da doença. Pacientes portadores de infecção grave causada por *P. falciparum* são considerados de emergência médica. Para estes adota-se um tratamento mais agressivo, utilizando doses de ataque dos fármacos Artemisinina, Quinina e Clindamicina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) (Tabela 3).

Fármaco	Uso
Cloroquina	Tratamento e quimioprofilaxia de infecção com parasitos sensíveis
Primaquina	Cura radical e profilaxia terminal das infecções causadas por <i>P. vivax</i> e <i>P. ovale</i>
Quinina	Tratamento oral de infecções causadas por <i>P.falciparum</i> resistente à cloroquina
Artemisinina	Tratamento da infecção por <i>P. falciparum</i> resistente a múltiplos fármacos

Tabela 3: Principais fármacos antimaláricos. Adaptado de (KATZUNG, 2008).

A cloroquina é o fármaco de escolha de tratamento e quimioprofilaxia, mas a resistência a essa droga torna sua utilidade comprometida, especialmente no caso do *P. falciparum*. A primaquina é um fármaco esquizonticida tissular agindo nas formas de *P. vivax* e *P. ovale*, todos os estágios hepáticos do parasito. Ambos são bem tolerados mesmo com uso prolongado, mas há registros de efeitos adversos graves, ainda que raros, como ototoxicidade irreversível, neuropatia periférica e arritmias cardíacas (KATZUNG, 2008).

Fármacos como quinina e artemisinina são utilizados como tratamento fundamental para a malária grave causada por *P. falciparum*. Apesar de possuírem elevada ação anti malárica, a toxicidade é um fator de preocupação. Após terapia prolongada reações adversas como anomalias visuais e auditivas, vômitos e até mesmo quando em doses terapêuticas podem causar hipoglicemia. Além disso, foi observado em estudos com animais que a artemisinina provocou teratogenicidade em animais e, por isso, deve ser evitada em mulheres grávidas (KATZUNG, 2008).

Precisamente, devido a todos esses efeitos adversos e, no caso das populações amazônicas, muitas vezes também devido ao difícil acesso ao tratamento, apesar da terapia alopática disponibilizada a população amazônica ainda usa de recursos naturais, fundamentando-se nos conhecimentos medicinais culturais para tratar diversas doenças, inclusive a malária.

Infelizmente, não existem muitos estudos sobre o uso medicinal de plantas nas comunidades amazônicas. Entre esses estudos, recentemente Coelho-Ferreira (2009) fez um extenso levantamento sobre o uso medicinal de plantas na comunidade de Marudá (Estado do Pará) e mostrou que é comum o uso das folhas de *Arrabidaea chica* (pariri), *Persea*

americana (abacate) e *Quassia amara* (quina) e o fruto da *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Pará) no tratamento tradicional da malária (COELHO-FERREIRA, 2009).

As indicações etnofarmacológicas da *B. excelsa* (Castanha-do-Pará) incluem anemia, sintomas da malária, fortalecimento e até a melhora do aspecto da palidez nos pacientes (COELHO-FERREIRA, 2009).

Apesar de estudos relacionarem a influência dos componentes presentes na Castanha-do-Pará na terapêutica da malária, até o momento não há nenhum trabalho científico na literatura que tenha estudado o possível efeito desse fruto na terapêutica para malária.

1.7 *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Castanha-do-Pará)

A Castanha-do-Pará é uma fruta nativa, típica da Floresta Amazônica, da espécie *Bertholletia excelsa* H.B.K., da família Lecythidaceae (SMITH, 2012). As árvores são consideradas vulneráveis a extinção, podendo chegar facilmente a 50 metros de altura e vivendo cerca de 1200 anos (LEMIRE *et al.*, 2010)

No Brasil, o domínio fitogeográfico dessa planta inclui as Regiões Norte (Amapá, Pará, Amazonas, Acre e Rondônia) e um estado do Centro-Oeste (Mato Grosso), com grande variedade de fitofisionomias (Figura 3).

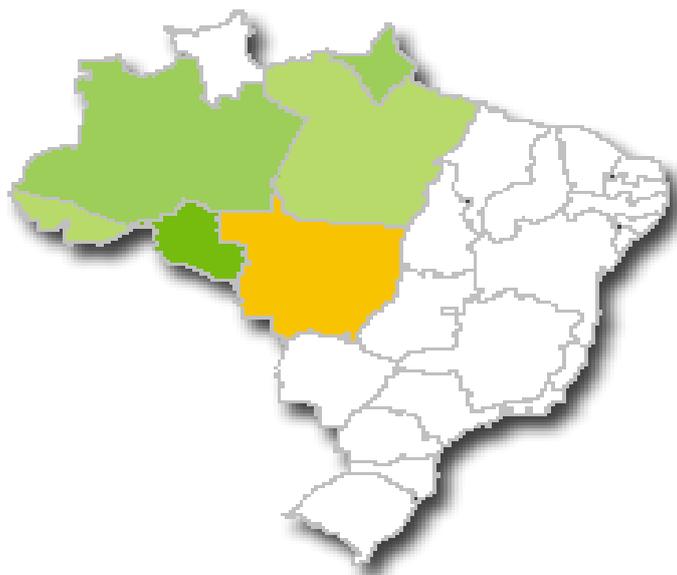


Figura 3: Distribuição geográfica da *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Pará) no Brasil. Fonte: Flora do Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB023424>). Em verde é mostrada a distribuição na região Norte e em amarelo, a distribuição no Centro-Oeste.

Esta planta predomina em Florestas de Igapó e Florestas de Terra-Firme, ocupando 49,3% do território brasileiro e se estendendo através da Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela e Guianas (SMITH, 2012).

O fruto da árvore pode pesar de 0,5 a 2,5 kg dependendo do número de castanhas em seu interior. Cada fruto pode conter de 10 a 25 castanhas, variando entre 3 e 5 cm (CHUNHIENG *et al.*, 2004, SCOLES *et al.*, 2012, FREITAS-SILVA *et al.*, 2011). A alta temporada de colheita dos frutos é de dezembro a abril (LEMIRE *et al.*, 2009) (Figura 4).



Figura 4: *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Pará) e amêndoas. Fonte: www.sciencemag.org

A Castanha-do-Pará é utilizada para exportação desde os anos 1800. Apesar de ser chamada “do Pará”, o principal produtor é o Estado do Amazonas com cerca de 42,7% e o Estado do Pará, responsável por 18,7%, segundo dados do IBGE (IBGE, 2009). Em toneladas, a produção de castanhas no Brasil chegou a 37.467, a maior expressão de produção dos 10 anos anteriores. (FREITAS-SILVA *et al.*, 2011) (Figura 5).

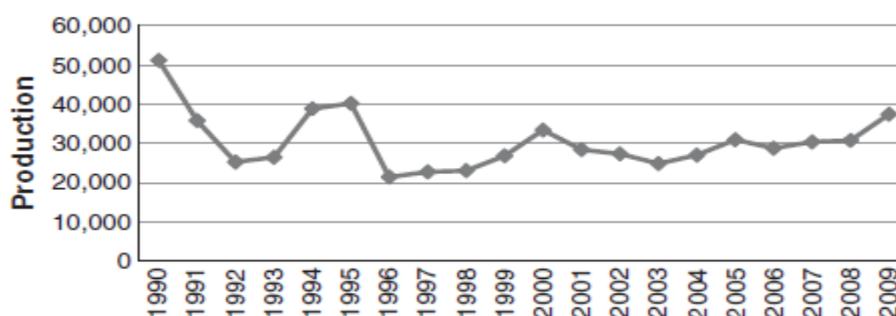


Figura 5: Produção anual da *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Pará) no Brasil (em toneladas) até 2009. Fonte: Freitas-Silva, 2011.

Desde 1986, estudos vem sendo realizados com a intenção de quantificar os elementos contidos na *B. excelsa*, demonstrando elevados níveis magnésio, selênio e aminoácidos (principalmente cisteína e metionina) (AMPE *et al.*, 1986, CHUNHIENG *et al.*, 2004).

Ao fracionar proteínas contidas na Castanha-do-Pará, Chunhieng e colaboradores (2004) provaram a existência de elevadas quantidades de selênio por grama de fruta, bem como quantidades elevadas desse elemento nas frações de proteínas. O estudo revelou um total de 126 µg/g de selênio, junto com outros componentes abundantes como magnésio (13.380 µg/g) e potássio (19.690 µg/g). Ainda, esse estudo apontou que o consumo de Castanha-do-Pará pode chegar a provocar intoxicação se alcançado os valores máximos de consumo diário de selênio (2400 a 3000 µg/g), provocando selenose (CHUNHIENG *et al.*, 2004).

Essa riqueza em minerais faz com que a Castanha-do-Pará seja uma fonte importante destes elementos para o consumo humano na região amazônica. Assim, na Região do Tapajós, estudos já demonstraram que apesar dos elevados níveis de selênio (2447 µg/L de sangue) detectados em ribeirinhos que consumiam Castanha-do-Pará em alta temporada, não havia evidências de intoxicação, bem como verificou-se diminuição deste valor para níveis normais quando fora de temporada (LEMIRE *et al.*, 2006, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A situação atual da malária no Brasil, ainda que em declínio, desperta grande preocupação quanto ao alto número de casos confirmados no país.

A região Amazônica, com seu histórico de imigração e clima favorável a reprodução do mosquito, tornou-se o principal cenário de manifestações da doença, concentrando 99% das ocorrências brasileiras.

O tratamento da malária com a medicina alopática atual tem sucesso limitado devido às situações de resistência e múltiplos efeitos adversos. Ainda, no caso das populações amazônicas, muitas vezes o difícil acesso ao tratamento dificulta ainda mais o uso adequado desses fármacos. Diante deste panorama, a utilização dos recursos naturais constitui uma alternativa essencial como adjuvante do tratamento farmacológico.

Assim, o uso de plantas e frutos com objetivos medicinais, baseado na sabedoria popular, é uma realidade frequente na população amazônica que, desde antepassados indígenas, usa das riquezas naturais da floresta no combate de diversas afecções. Dentro dessa perspectiva, em 2009 foi descrito pela primeira vez que a *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Pará) vem sendo usada popularmente como uma ferramenta no combate aos sintomas clínicos da malária.

Entretanto, até hoje não existe na literatura nenhum estudo com base científica que sustente ou rejeite o uso desse fruto em esse contexto.

Este trabalho, portanto, se propõe estudar uma possível relação entre o consumo desta fruta de fácil acesso a população e amplo consumo na região, e uma possível melhora nos aspectos clínicos (parasitemia, peso corporal e dos órgãos, sobrevivência e parâmetros laboratoriais) produzidos pela malária.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo avaliar o possível efeito protetor da *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Pará) em modelo animal de malária (camundongos infectados com *Plasmodium berghei*).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a sobrevivência de camundongos infectados com *P. berghei* e/ou pré-tratados com *B. excelsa*.
- Avaliar, através de microscopia ótica, o nível sanguíneo de parasitemia após a infecção de camundongos com *P. berghei* e/ou pré-tratados com *B. excelsa*.
- Realizar o acompanhamento de peso corporal de animais controle, infectados e/ou pré-tratados com *B. excelsa* conforme progressão da infecção.
- Baseando-se nos dados acima, avaliar o peso do fígado e do baço dos animais infectados com *P. berghei* e/ou pré-tratados com *B. excelsa* em um momento da progressão da infecção.
- Nesse mesmo momento da progressão da infecção, verificar parâmetros laboratoriais (bioquímicos e hematológicos) no 10º dias após a infecção, nos animais infectados com *P. berghei* e/ou tratados com *B. excelsa*: hemograma completo e níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (ASP) e gama glutamiltransferase (GGT).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e grupos experimentais

Foram usados camundongos BALB/c pesando de 31 a 38 g, de idades entre 2 e 3 meses e criados no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Os animais foram mantidos com 12 horas de ciclo claro/escuro, temperatura controlada (24-25°C) e acesso livre a comida e água. O presente trabalho foi submetido para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do ICB- UFPA, com número de depósito 167-13.

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: Grupo 1 – Controle (administrado água), Grupo 2 – *Plasmodium berghei* (somente infectado) e Grupo 3 – Castanha + *Plasmodium berghei* (pré tratado e posteriormente infectado).

4.2 Estabelecimento do modelo animal de malária com *P. berghei* em camundongos

A infecção dos animais foi feita a partir do sangue de camundongos previamente infectados.

Inicialmente, foram retirados 800 µl de sangue por punção cardíaca do camundongo infectado. 100 µl de heparina e 100 µl de PBS foram adicionados a esse volume. Deste, foram retirados 100 µl e diluídos em 900 µl de PBS. Finalmente, 100 µl dessa mistura (com aproximadamente 10⁶ células parasitadas) foi injetado em cada animal por via intraperitoneal.

4.3 Tratamento com *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Pará)

Com o objetivo de aproximar o desenho experimental à realidade de consumo da Castanha-do-Pará, o fruto usado no trabalho foi obtido daquele disponibilizado comercialmente no mercado do Ver-o-Peso para consumo humano.

Assim, a Castanha-do-Pará “in natura” foi triturada e liofilizada para melhorar a homogeneização em água. Posteriormente, o liofilizado foi diluído em água destilada na

concentração de 4mg/ml e sonicado duas vezes, durante 15 segundos. Esta solução é conservada a 4°C até ser usada.

A solução de Castanha-do-Pará, previamente homogeneizada por agitação, foi administrada aos animais diariamente durante onze dias na dose de 0,04 g/kg via gavagem.

4.4 Análise da sobrevivência

A análise de sobrevivência foi feita diariamente por meio do acompanhamento dos grupos experimentais, observando a sobrevida em períodos e intervalos idênticos (Long rangtest).

4.5 Acompanhamento da massa corporal

Para acompanhamento da massa corpórea foi utilizado o parâmetro de peso.

A massa dos animais foi acompanhado antes da infecção e nos dias 3°, 7°, 10°, 16° e 18° dias após a infecção. A mensuração do peso foi realizada em uma balança analítica com os camundongos sob quatro patas na superfície da balança.

4.6 Avaliação da parasitemia

Para a avaliação do grau de parasitemia dos animais, nos dias 3°, 7°, 10° após a infecção, foi retirada uma gota de sangue da veia localizada na cauda do animal e colocada em lâmina (extensão sanguínea). Posteriormente, a lâmina foi incubada com metanol durante dois minutos, e em seguida corada com Giemsa a 5% durante dez minutos a temperatura ambiente.

A parasitemia foi analisada pela contagem células parasitadas em um total de 800 hemácias, nas diferentes fases do plasmódio e conforme progressão da infecção. Foi considerado como hemácias infectadas as células que apresentaram os plasmódios em formato

de anel, formatos puntiformes na extremidade da célula e presença de esporozoítos no interior da hemácia, conforme figura 6.

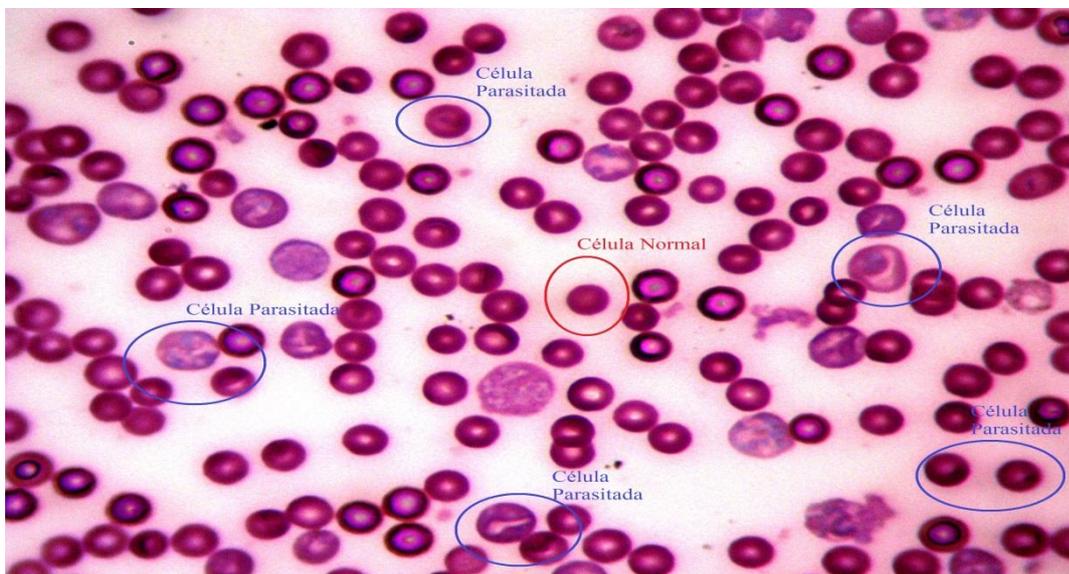


Figura 6: Extensão sanguínea de camundongo BALB/c infectado com *P. berghei*. Em destaque podem ser observadas células normais e parasitadas.

4.7 Pesagem do fígado e baço

Baseado nos dados de sobrevivência, peso e parasitemia, foi escolhido o décimo dia após a inoculação do *Plasmodium*, para verificar se existiam diferenças entre os grupos no peso dos tecidos (fígado e baço) e nos parâmetros laboratoriais.

Assim, o acompanhamento dos órgãos foi determinado no 10º após a infecção, através da pesagem do fígado e baço, em balança analítica.

4.8 Punção cardíaca e obtenção de amostras sanguíneas

Também, no décimo dia após a inoculação do parasita, amostras sanguíneas foram retiradas, para análises laboratoriais a partir de punção cardíaca nos animais anestesiados com Cetamina 0,1mg/mL e Xilasina 0,023mg/mL. Através de injeções intraperitoneais, os animais foram sedados nas doses de 80 mg/kg de Cetamina e 15mg/kg de Xilasina e, verificada

anestesia, iniciou-se processo cirúrgico. Em uma seringa de 1mL contendo previamente 50 µL de EDTA, aspira-se de 800 a 950 µl de sangue. Posteriormente a retirada, esse volume é despejado em tubo contendo 50 µL de EDTA. O sangue retirado foi dividido para realização do hemograma e dos testes feitos por espectrofotometria, sendo que para estes as amostras foram previamente centrifugadas a 3.500 rpm durante 10 minutos, em seguida aspirado o plasma para a realização dos ensaios.

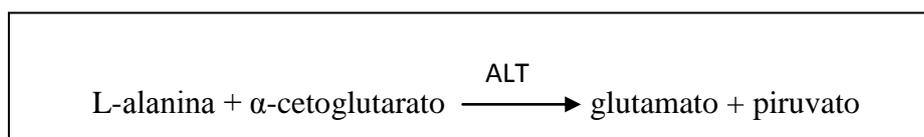
4.9 Avaliação dos parâmetros de análises clínicas

4.9.1 Hemograma

Imediatamente após a punção cardíaca no 10º dia pós infecção foi realizada a análise do hemograma completo através do equipamento Micros60 (Horiba). A leitura é feita por bioimpedância, a partir de 100 µl de sangue aspirado na agulha do equipamento, onde foram analisados leucócitos, hemácias totais, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, volume corpuscular médio de hemácias, hemoblonina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, linfócitos, monócitos e granulócitos. O resultado desses valores é dado a partir da comparação dos grupos tratados em relação ao grupo controle.

4.9.2 Enzimas hepáticas no sangue: Alanina Aminotranferase (ALT), Aspartato Aminotranferase (AST) e γ -Glutamiltransferase (GGT)

A quantificação de ALT foi feita através da utilização de kit de ensaio Transaminase Pirúvica (Labtest) no plasma. O kit utilizado promove a transferência do grupo amina da alanina para cetoglutarato e, os produtos dessa reação, serão piruvato e glutamato, de acordo com a equação abaixo



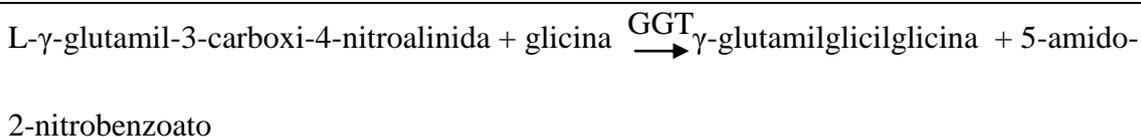
O piruvato formado reage com a 2-4-dinitrofenilhidrazina formando hidrazona. A intensidade da coloração de hidrazona formada em meio alcalino é diretamente proporcional a quantidade de piruvato, que é determinado em função da enzima. O ensaio tem 4 fases e a reação lida em espectrofotometria em um comprimento de onda de 490nm.

A determinação de AST foi feita no plasma, através de kit Transaminase Oxalacética (Labtest). O kit atua transferindo o grupo amina e o produto dessa reação de transaminação são oxaloacetato e glutamato. O oxalacetato formado é medido através da formação de hidrazona, conforme equação abaixo:



A hidrazona formada em meio alcalino, tem intensidade proporcional à quantidade de oxalacetato, que é determinado em função da atividade enzimática. O processo é dividido em 4 etapas e a reação pode ser lida em espectrofotometria em um comprimento de onda de 500 nm.

A determinação de Gama Gutamil Transferase (γ -GT) foi dada a partir da utilização de kit destinado à determinação da enzima no plasma (Katal). O princípio de ação do kit é baseado na propriedade de que a enzima γ -GT catalisa a reação de transferência do grupamento glutamil do L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroalínida para a glicina, conforme abaixo:



A concentração da enzima então é determinada a partir da velocidade de transformação do 5-amido-2 nitrobenzoato que é diretamente proporcional a quantidade de γ -GT na amostra. Formado um composto de coloração avermelhada, a reação pode então ser lida em espectrofotometria em um comprimento de onda de 405 nm.

4.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do Software GraphPad InStat 3. Os grupos foram analisados com o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade (distribuição gaussiana) e, confirmada a normalidade dos grupos, foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey ou teste t de Student. Os resultados foram considerados valores estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Sobrevivência dos animais após infecção com *Plasmodium berghei*

A sobrevivência dos animais infectados com o *P. berghei* foi analisada de acordo com a contagem dos dias após a infecção (Figura 7). Sendo assim, eles foram analisados até a morte de todos os indivíduos. Embora não tenha sido observada uma diferença muito expressiva entre os grupos, ficou evidente que os animais infectados não tratados com Castanha tiveram tendência a ter as primeiras mortes. Ainda, o último animal do grupo infectado e sem pré-tratamento sobreviveu até 25º dias após infecção, enquanto que o último animal do grupo pré-tratado sobreviveu 27 dias após infecção.

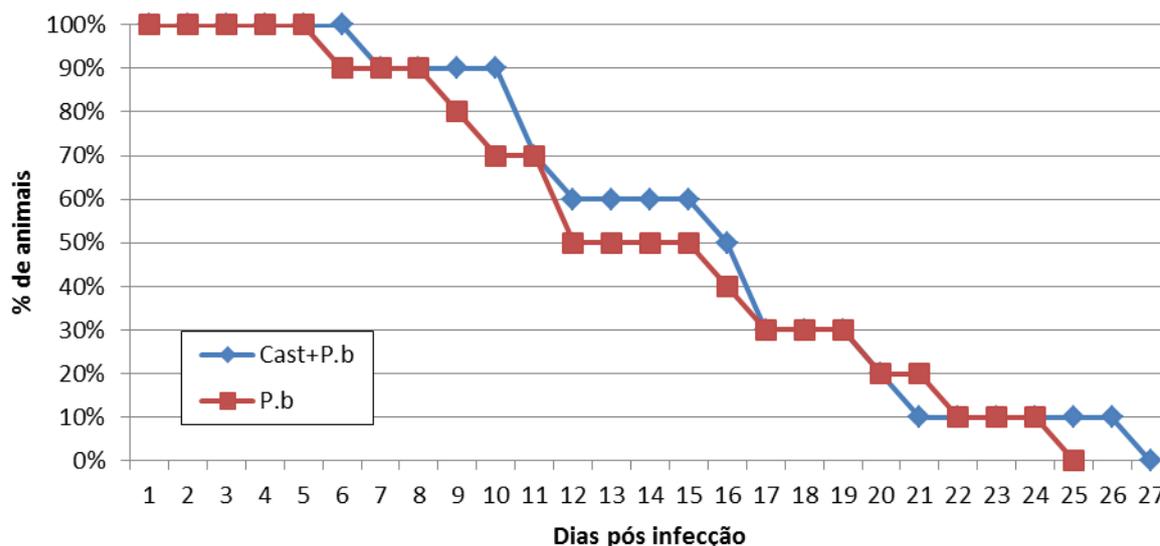


Figura 7: Porcentagem de sobrevivência dos animais infectados com *Plasmodium berghei* (P.b) e dos animais pré-tratados com Castanha-do-Pará e infectados posteriormente (Cast+P.b), acompanhados até o último dia de sobrevivência (n=10).

5.2 Evolução do peso dos animais

Para confirmar o estabelecimento do modelo de malária, o peso dos animais foi registrado após a infecção com *P. berguei* (Figura 8). Sete dias após a inoculação, já foram detectadas perdas significativas no peso dos animais infectados em relação ao grupo controle. Ainda, essas perdas aumentaram conforme a evolução da doença.

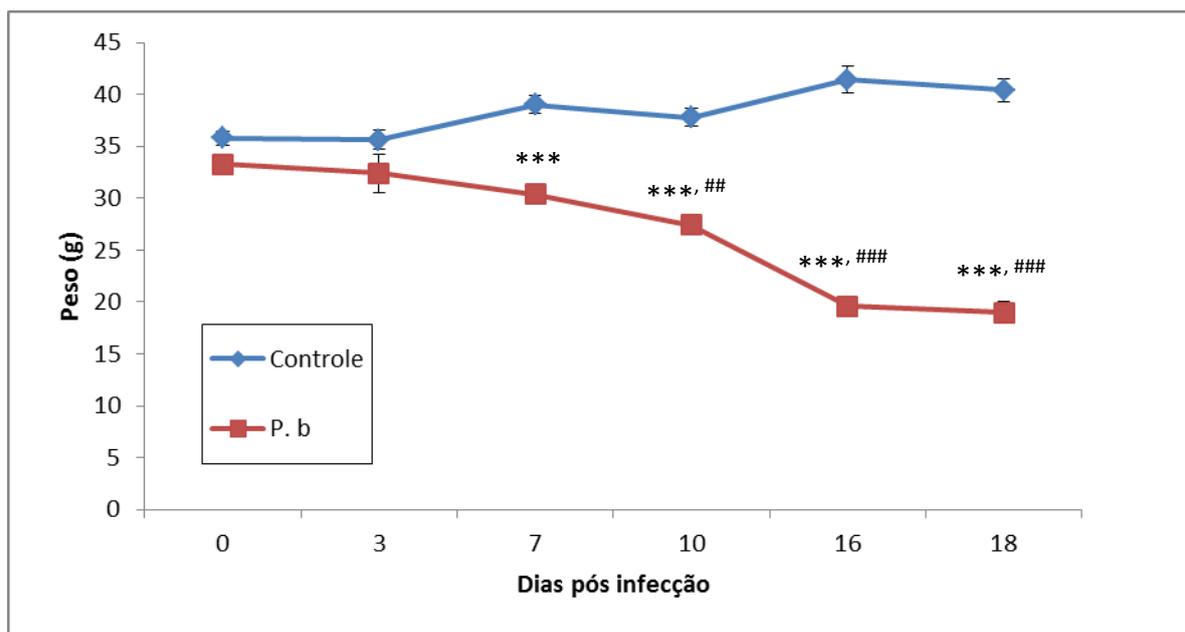


Figura 8: Acompanhamento do peso dos animais infectados com *Plasmodium berguei* (P.b) e dos animais do grupo controle. Teste t de Student. *** $P < 0,001$ vs grupo Controle, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ vs dia 0 do grupo *P. b.* (n=10).

Interessantemente, o pré-tratamento com Castanha-do-Pará foi capaz de proteger os animais infectados preservando o peso do animal por mais tempo (unicamente, após dez dias de infecção é que começaram a serem detectadas as primeiras perdas de peso significativas em relação ao peso dos animais do grupo controle) (Figura 9). Ainda, cabe destacar que, quando comparados os grupos infectados com e sem pré-tratamento, os animais que receberam Castanha-do-Pará sempre mantiveram um peso maior que aqueles que não receberam até 16 dias após a inoculação do *P. berghei* (Figura 9).

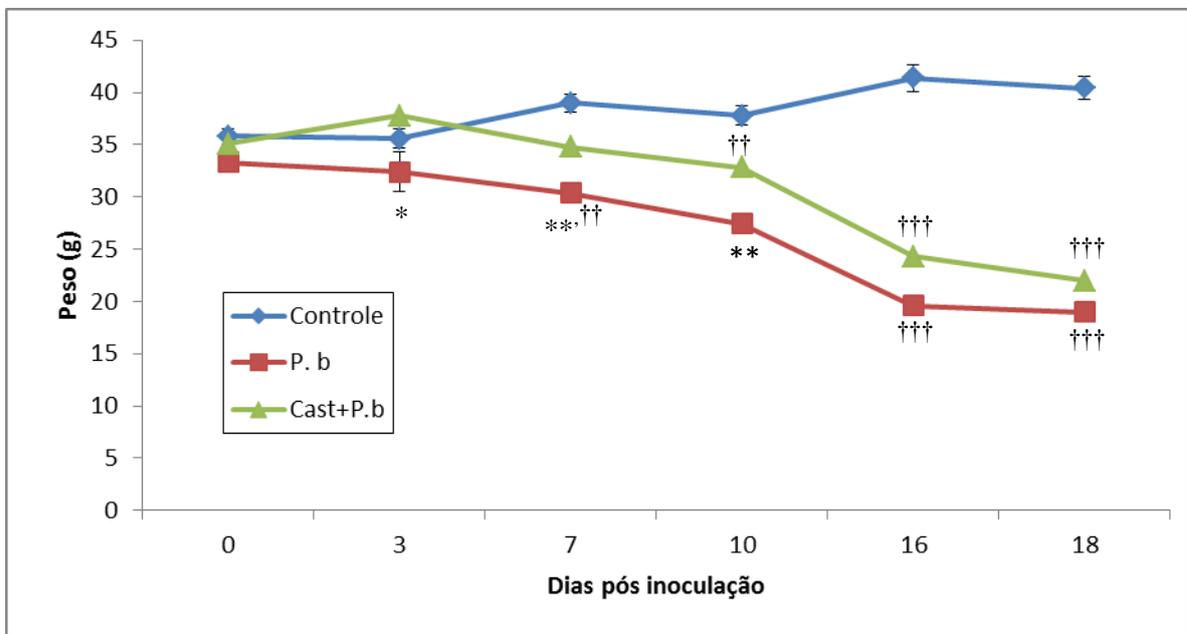


Figura 9: Acompanhamento do peso dos animais dos grupos Controle, infectados com *Plasmodium berghei* (P.b) e pré tratados com Castanha-do-Pará e infectados com *Plasmodium berghei* (Cast+P.b). Teste ANOVA seguido de *post hoc* Tukey. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs Cast+P.b, †† $P < 0,01$ e ††† $P < 0,001$ vs Controle (n=10).

5.3 Análise do nível de parasitemia

Em relação ao grau de parasitemia dos animais, já após três dias da infecção verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figura 10). Entretanto, devido à grande variabilidade dentro dos grupos, unicamente 10 dias após infecção é que a diferença entre as médias dos grupos no nível de parasitemia foram bem evidentes, aumentando ainda mais após 18 dias de infecção.

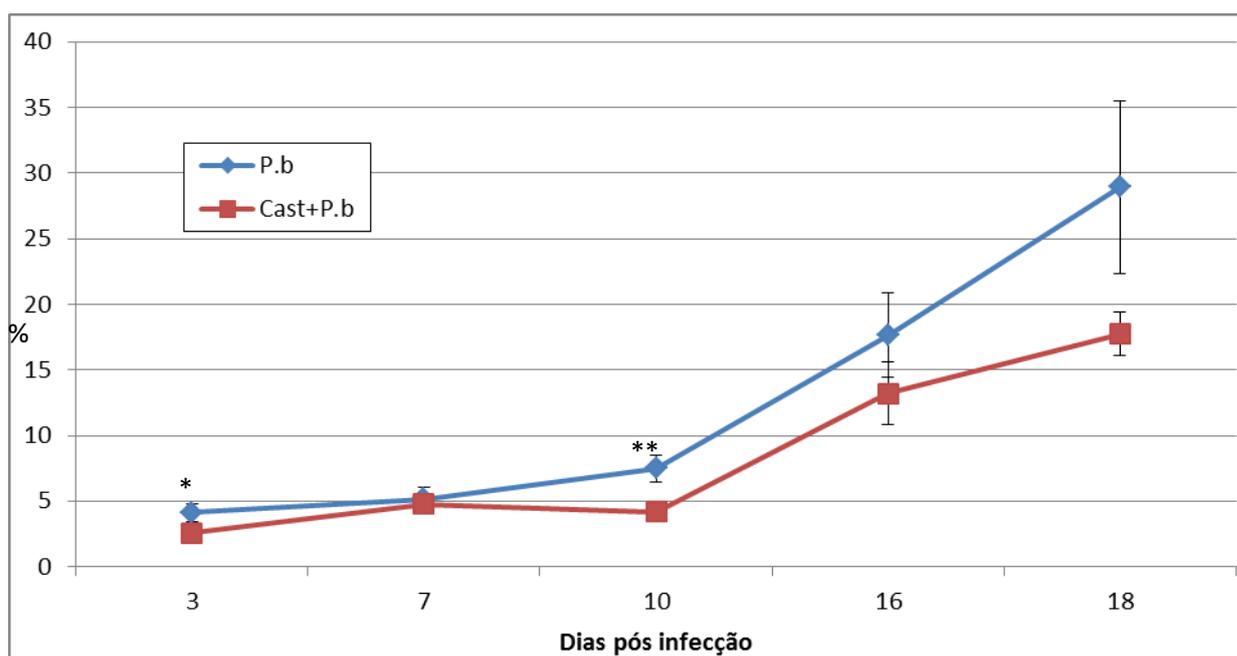


Figura10: Acompanhamento da porcentagem de células infectadas dos grupos com (Cast+P.b) e sem pré tratamento (P.b) com Castanha nos dias após inoculação. Teste t de Student. Correção Welch. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs Cast+P.b. (n=10).

Assim, foi escolhido o décimo dia após a inoculação do *Plasmodium*, para verificar se existiam diferenças entre os grupos no peso dos tecidos (fígado e baço) e nos parâmetros laboratoriais.

5.4 Avaliação de parâmetros hematológicos de rotina

5.4.1 Análise do nível de plaquetas

As diferenças do nível de plaquetas não foram observadas como estatisticamente significativas entre os grupos Controle e infectado com *P. berghei* (Figura 11). Entretanto, é possível identificar uma tendência para a diminuição das médias das contagens de plaquetas nos animais infectados com *P. berghei* sem pré tratamento.

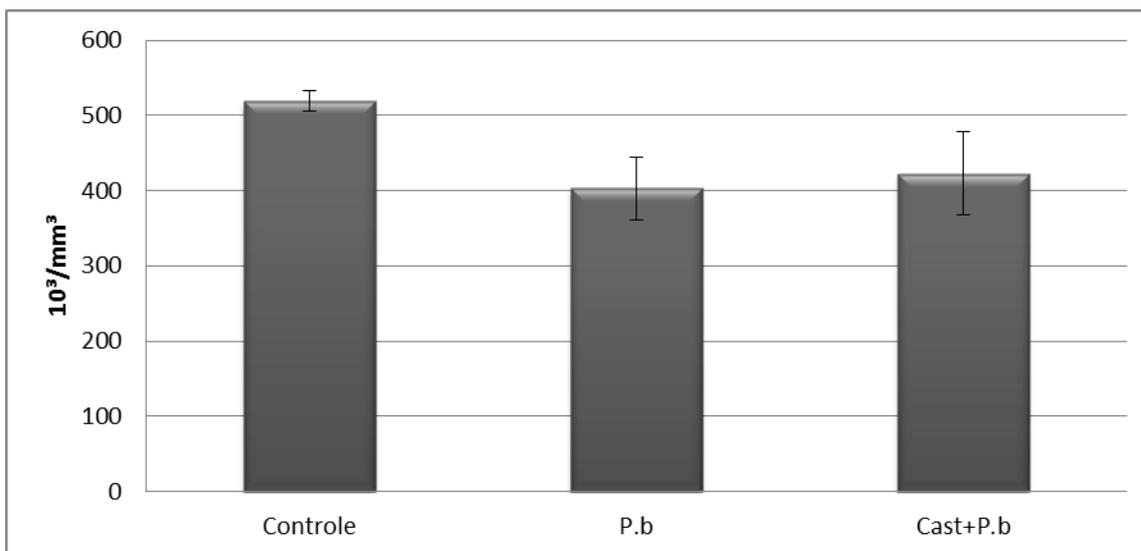


Figura 11: Contagem de plaquetas nos grupos experimentais no 10º dia de infecção. Teste ANOVA. P.b: infectados com *Plasmodium berghei*; Cast+ P.b: Pré tratamento + infecção com *Plasmodium berghei* (n= 3-8).

5.4.2 Análise do nível de hemácias totais

No décimo dia de infecção, verificou-se que a contagem de hemácias totais dos dois grupos de animais infectados com o *P. berghei* (grupos com e sem pré-tratamento com Castanha-do-Pará) não apresentaram diferença significativa entre si, mas ambos diferiram significativamente dos valores do grupo Controle (Figura 12).

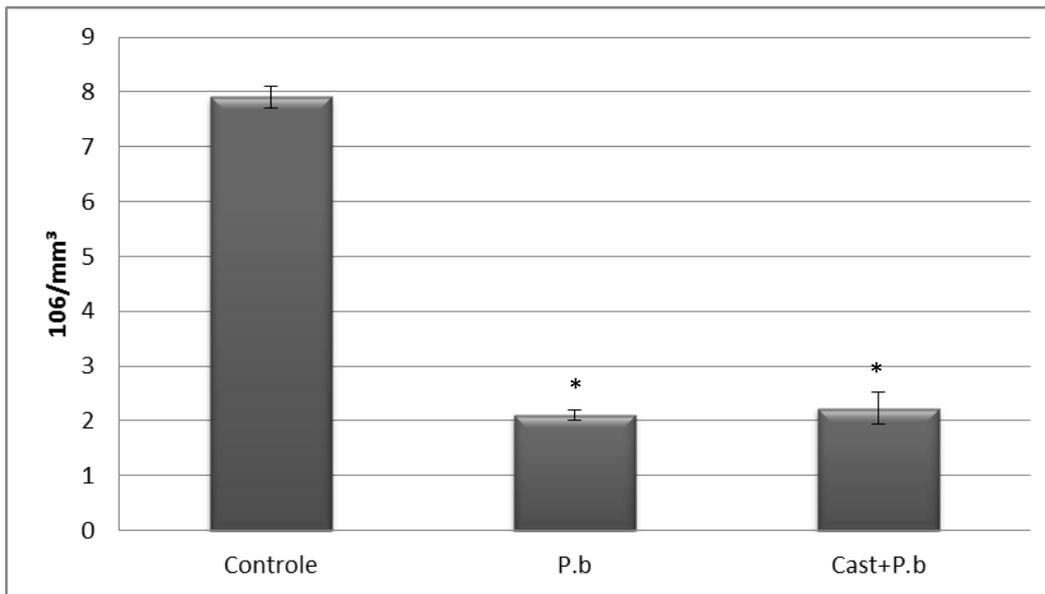


Figura 12: Quantificação de hemácias totais nos grupos experimentais no 10º dia de infecção. Teste ANOVA seguido de *post hoc* Tukey. *P < 0,001 vs Controle. P.b: infectados com *Plasmodium berghei*; Cast+ P.b: Pré tratamento + infecção com *Plasmodium berghei* (n= 4-8).

5.4.3 Análise do nível de hemoglobina

A quantificação de hemoglobina no décimo dia de infecção demonstrou diferença significativa dos grupos infectados com *Plasmodium berghei* em relação ao grupo controle (Figura 13). No 10º dia de infecção, verificou-se que a contagem de hemoglobina dos animais infectados com o *P. berghei* e dos animais pré tratados com Castanha não apresentavam diferença significativa entre si, mas ambos diferentes estatisticamente do grupo Controle

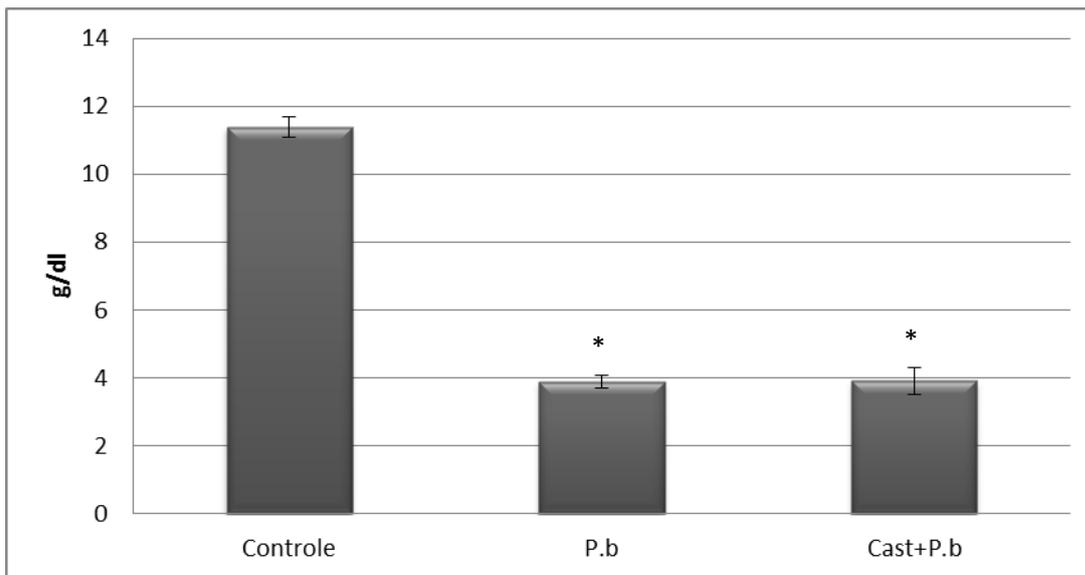


Figura 13: Quantificação de hemoglobina nos grupos experimentais no décimo dia pós inoculação. Teste ANOVA seguido de *post hoc* Tukey. * $P < 0,001$ vs Controle. P.b: infectados com *Plasmodium berghei*; Cast+ P.b: Pré tratamento + infecção com *Plasmodium berghei* (n= 4-8).

5.4.4 Avaliação do nível de hematócrito

A contagem do hematócrito dada em porcentagem foi verificada no décimo dia de infecção (Figura 14). Observou-se que os animais infectados com o *P. berghei* não apresentaram diferença significativa entre si, mas ambos os grupos diferiram estatisticamente do grupo Controle.

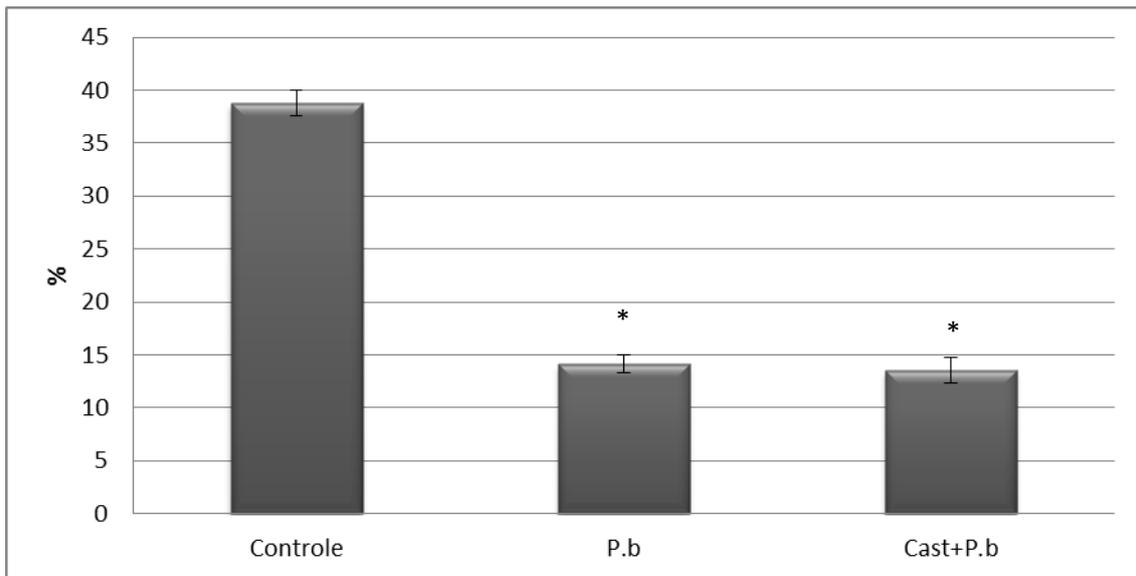


Figura 14: Porcentagem do hematócrito nos grupos experimentais no 10º dia de infecção. Teste ANOVA seguido de *post hoc* Tukey. * $P < 0,001$ vs Controle. P.b: infectados com *Plasmodium berghei*; Cast+ P.b: Pré tratamento + infecção com *Plasmodium berghei* (n= 4-8).

5.4.5 Análise do nível de leucócitos totais

A infecção com *P. berghei* durante dez dias implicou em um aumento significativo na contagem dos leucócitos totais nas amostras de sangue dos animais infectados (Figura 15). Em este caso, o pré-tratamento com Castanha-do-Pará não teve um efeito significativo em relação ao grupo infectado e não tratado.

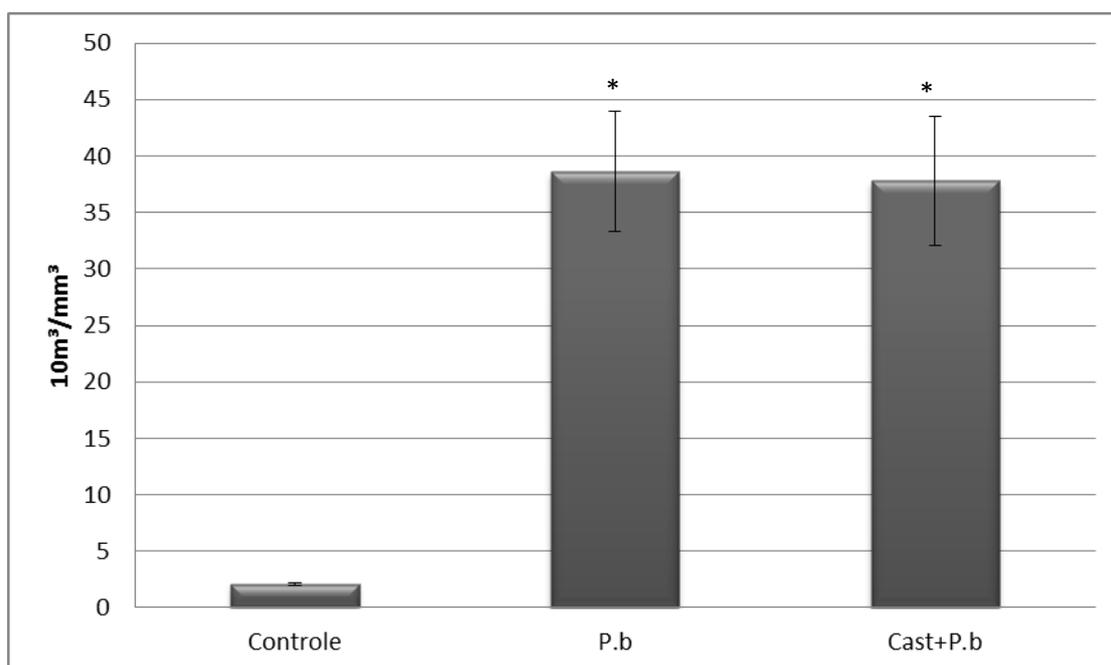


Figura 15: Quantificação de leucócitos totais nos grupos experimentais no 10^o dia de infecção. Teste ANOVA seguido de *post hoc* Tukey. * $P < 0,001$ vs Controle. P.b: infectados com *Plasmodium berghei*; Cast+P.b: Pré tratamento + infecção com *Plasmodium berghei* (n=3-8).

5.5 Avaliação do peso dos órgãos: Fígado e Baço

5.5.1 Peso do Fígado

Como esperado, após 10 dias de infecção, verificou-se que o peso do fígado (retirado com vesícula biliar) dos animais infectados com o *P. berghei* foi significativamente maior que aquele dos animais não infectados (grupo controle) (Figura 16), indicando que a infecção afetou o fígado provocando hepatomegalia.

Uma análise qualitativa do aspecto macroscópico do órgão confirmou a diferença dos grupos infectados em relação ao grupo controle, de forma que o pré-tratamento com Castanha-do-Pará não pareceu proteger significativamente o peso desse órgão. Foi evidente que nesse momento da infecção, a hepatomegalia nos grupos infectados com o *Plasmodium berghei* foi aparente tanto no aspecto de coloração quanto em tamanho do órgão (Figura 17).

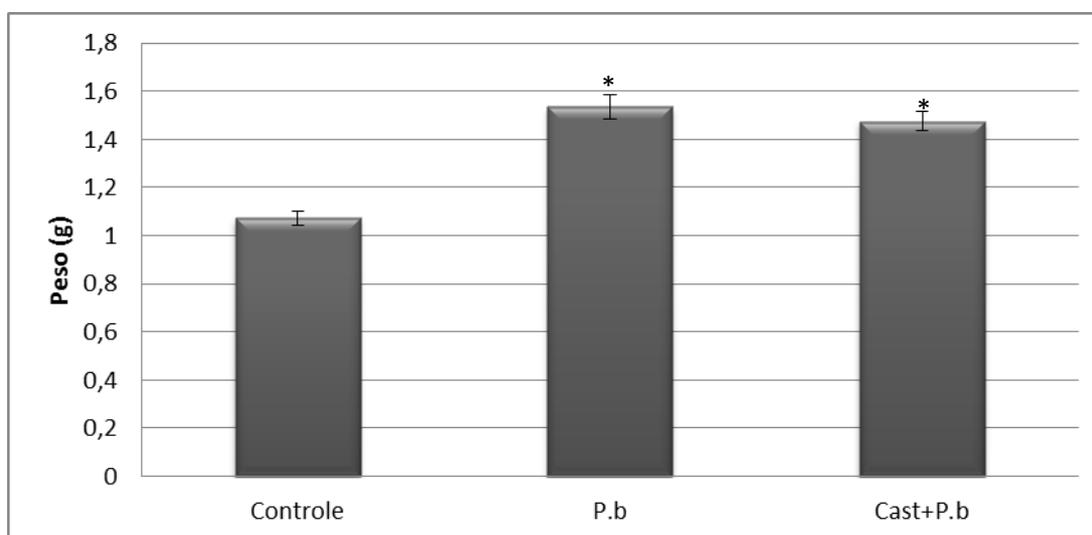


Figura 16: Peso do fígado dos animais controles, infectados com *Plasmodium berghei*(P.b) e pré-tratados com Castanha-do-Pará e infectados com *P.berghei* (Cast+P.b). Teste ANOVA seguido de *post hoc*Tukey. * $P < 0,001$ vs Controle (n=5- 11).

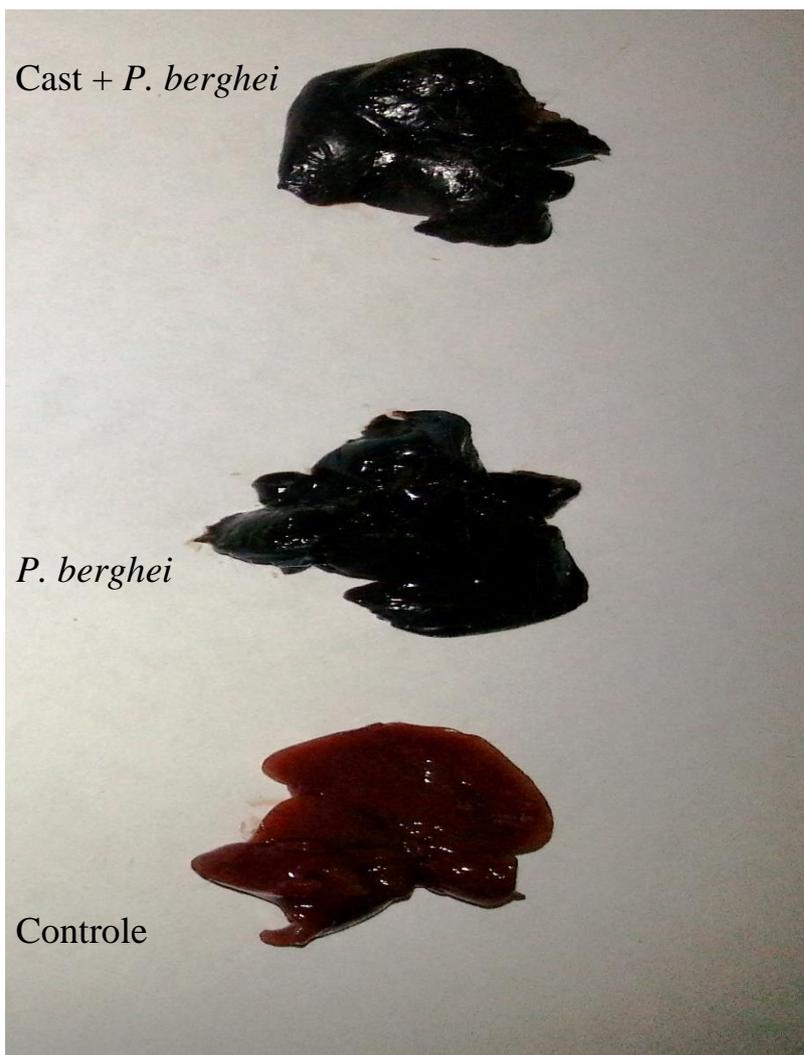


Figura 17: Fotos representativas dos fígados retirados no décimo dia de infecção de animais dos grupos experimentais.

5.5.2 Peso do Baço

No décimo dia de infecção, os animais infectados com *P. berghei* apresentaram uma esplenomegalia significativa em relação ao grupo controle (Figura 18). Interessantemente, o pré-tratamento com Castanha-do-Pará foi capaz de prevenir parcialmente esse aumento do baço provocado pela infecção de forma significativa.

Diante da análise qualitativa do aspecto macroscópico do órgão confirmou-se diferença dos grupos infectados em relação ao grupo controle. Ainda, o tratamento com Castanha-do-Pará pareceu proteger parcialmente em relação ao aspecto desse órgão, demonstrando o aspecto de menor esplenomegalia no décimo dia de evolução da infecção (Figura 19).

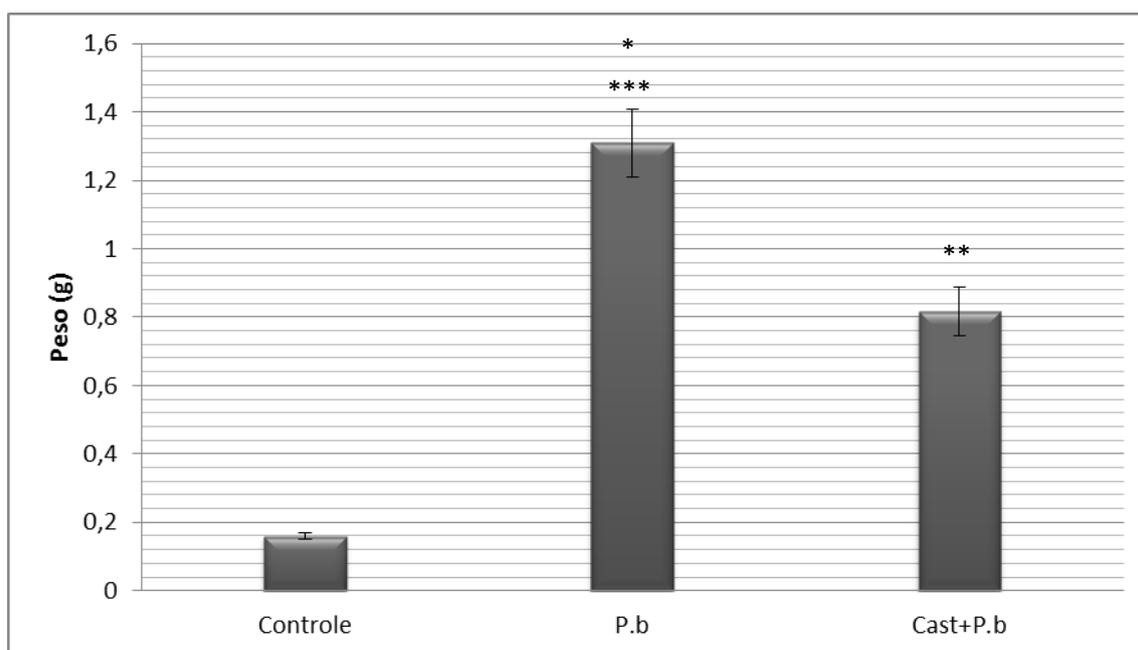


Figura 18: Peso do baço dos animais controles, infectados com *Plamodium berghei* (P.b) e pré-tratados com Castanha-do-Pará e infectados com *P.berghei* (Cast+P.b). Teste ANOVA seguido de *post hoc* Tukey. * $P < 0,05$ vs Cast + P.b ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs Controle (n=5-10).

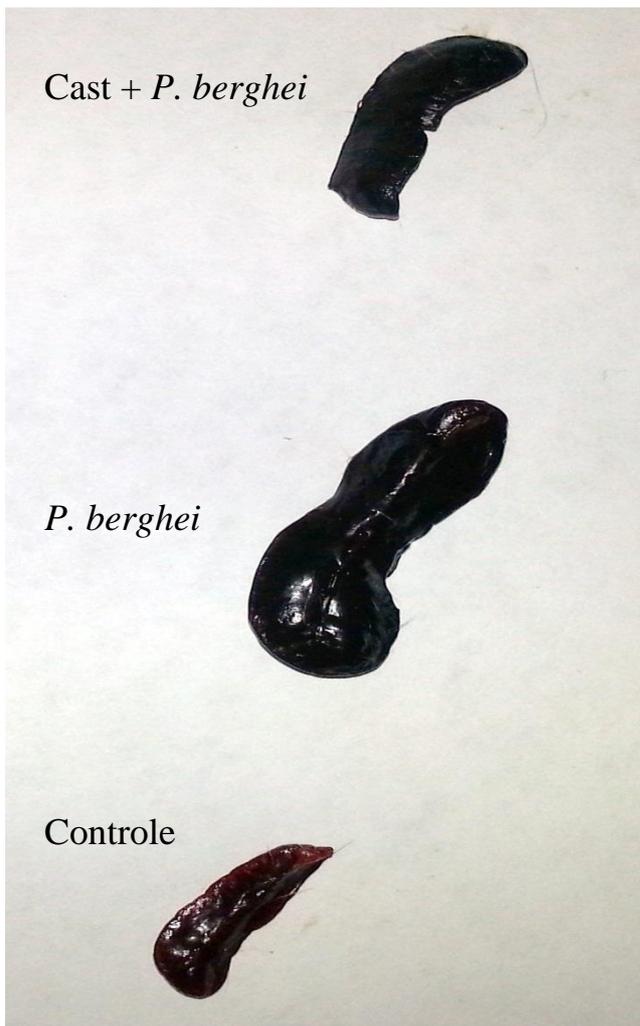


Figura 19: Fotos representativas dos baços retirados de animais dos grupos experimentais, no décimo dia pós inoculação.

5.6 Avaliação dos níveis sanguíneos de enzimas hepáticas

5.6.1 Nível de Aspartato Aminotranferase (AST)

A quantificação da enzima Aspartato Aminotransferase foi verificada no 10º dia pós inoculação com *Plasmodium berghei* (Figura 20). Os animais infectados com o *P. berghei* e os animais pré tratados com Castanha não apresentaram diferença significativa entre si, mas ambos diferiram estatisticamente do grupo Controle.

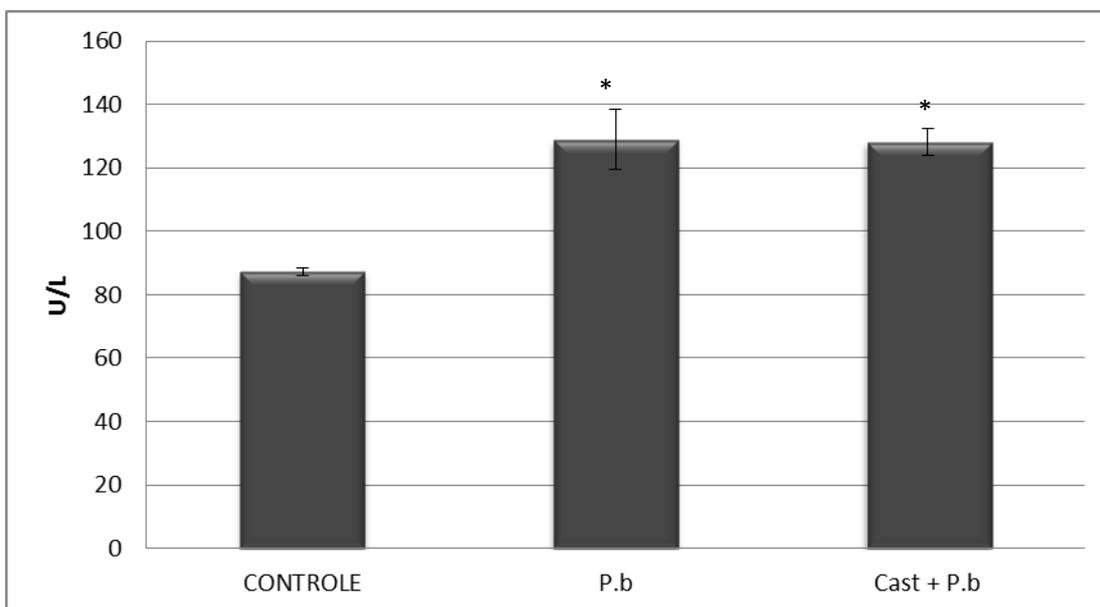


Figura 20: Quantificação enzimática de Aspartato Aminotransferase nos grupos testados no 10º dia de infecção. Teste ANOVA seguido de *post hoc* Tukey.* $P < 0,001$ vs Controle.P.b: infectados com *Plasmodium berghei*; Cast+ P.b: Pré tratamento + infecção com *Plasmodium berghei* (n= 5-10).

5.6.2 Nível de Alanina Aminotransferase (ALT)

A dosagem enzimática de Alanina Aminotransferase foi analisada no décimo dia pós inoculação com *Plasmodium berghei* (Figura 21). Foi observada diferença estatisticamente significativa do grupo infectado em relação ao controle. Interessantemente, os animais que receberam pré-tratamento com Castanha, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo *P. berghei* e, também, em relação ao grupo controle.

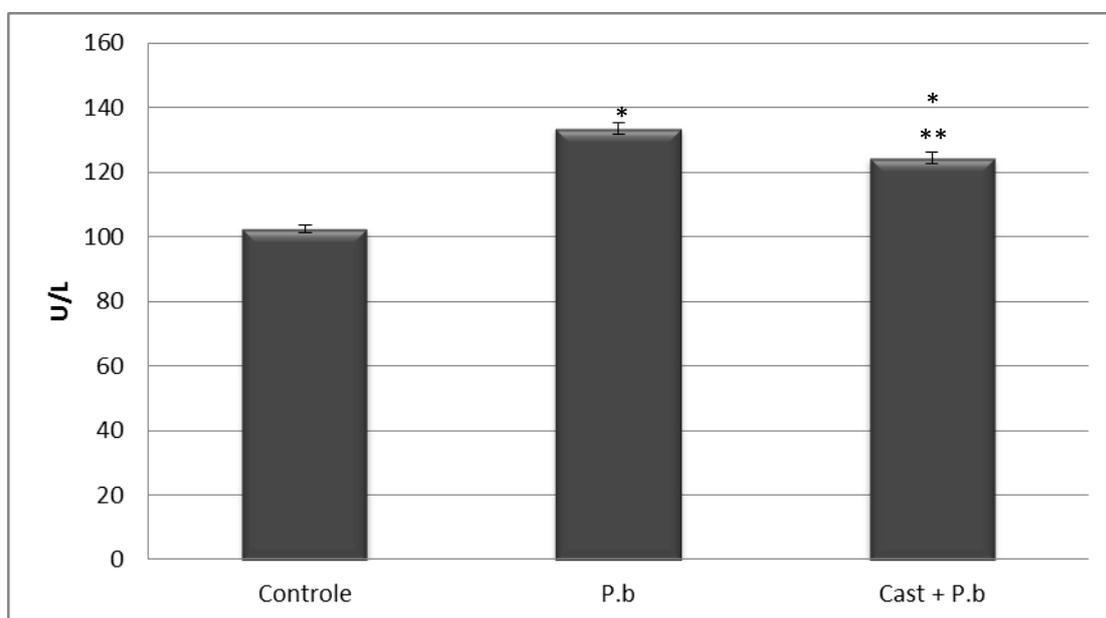


Figura 21: Dosagem enzimática de Alanina Aminotransferase nos grupos experimentais no 10º dia de infecção. * $P < 0,01$ vs Controle; ** $P < 0,01$ vs P.b. P.b: somente infectados com *Plasmodium berghei* ; Cast+ P.b: Pré tratamento + infecção com *Plasmodium berghei* (n= 5-10).

5.6.3 Nível de γ -GlutamylTransferase (GGT)

No décimo dia pós infecção mediu-se a enzima GGT (Figura 22). Verificou-se que os animais do grupo infectado com *P. berghei* manifestaram diferença estatisticamente significativa tanto em relação ao grupo controle quanto ao grupo pré tratado com Castanha. Estes últimos, não apresentaram diferenças que fossem estatisticamente significativas entre si.

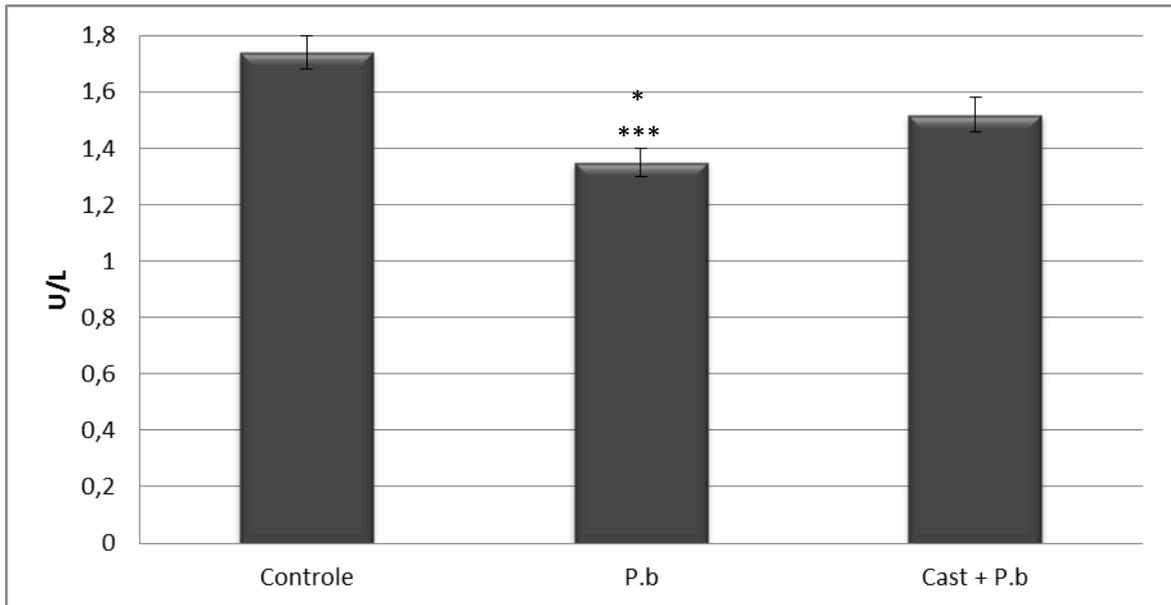


Figura 22: Medição da enzima GGT nos grupos experimentais no 10º dia de infecção. P.b: animais infectados com *Plasmodium berghei*; Cast+ P.b: Pré tratamento + infecção com *Plasmodium berghei*. Teste ANOVA seguido de *post hoc* Tukey. * $P < 0,05$ vs Cast + P.b e *** $P < 0,001$ vs Controle, (n= 5-10).

6 DISCUSSÃO

A malária é uma doença infecciosa, responsável por um elevado número de mortes anualmente, sendo endêmica nas Américas em, pelo menos, 21 países. O Brasil é o país com o maior número de casos, localizados especialmente na Região Amazônica (WHO, 2011). Neste sentido, a utilização dos recursos naturais como fitoterápicos capazes de atenuar ou diminuir os sintomas clínicos da infecção vem acontecendo há décadas por serem baratos, relativamente seguros e de fácil acesso e, por influenciarem benéficamente em pacientes que são resistentes à utilização de drogas (BOTSARIS, 2007; BAGAI *et al.*, 2012; RAJAN & BAGAI, 2013).

Neste trabalho, pela primeira vez, demonstrou-se que a *Bertholletia excelsa* melhorou parâmetros característicos da progressão da doença em animais infectados, comprovando cientificamente as indicações sugeridas pela medicina tradicional (COELHO-FERREIRA, 2009). Para isso, foram avaliados parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos de animais da linhagem BALB/c infectados com o *Plasmodium berghei*, sendo submetidos ou não a pré tratamento com *B. excelsa*.

O modelo experimental neste estudo com *P. berghei* é bem estabelecido na literatura, de forma que tanto o ciclo de vida quanto os estágios de desenvolvimento deste *Plasmodium* no hospedeiro murino, são semelhantes aos verificados no hospedeiro humano (LAMB *et al.*, 2006). Assim, esse desenho com animais da linhagem BALB/c torna-se adequado devido à susceptibilidade destes animais a desenvolverem características típicas da malária endêmica, como por exemplo, o nível de parasitemia, dilatação dos órgãos ou a resposta imunológica, entre outros (LAMB *et al.*, 2006; NEGREIROS *et al.*, 2009; ALAKADAROU *et al.*, 2013).

Os animais infectados foram acompanhados até o dia do óbito, verificando-se a sobrevivência dos animais (Figura 7) ao longo do período de infecção assim como alterações no peso (Figura 8 e 9) e porcentagem de células infectadas (Figura 10).

No nosso trabalho, a sobrevivência dos animais do grupo P.b foi, em média, de 13,9 dias (Figura 7). Analisando os estudos realizados com este modelo, é encontrada, de fato, uma grande variabilidade na sobrevivência média dos animais (desde pouco mais de 7 dias até mais de 25 dias (BALLAL *et al.*, 2011; BAGAI *et al.*, 2012; CHANDEL *et al.*, 2012).

Entretanto, o dado encontrado já indica que no nosso trabalho, conseguimos estabelecer um modelo de malária mais semelhante ao que acontece no humano.

A utilização de fitoterápicos capazes de influenciar no quadro clínico da malária é uma alternativa adotada pela população e muitos trabalhos foram realizados para determinar as suas atividades (VIGNERON *et al.*, 2005; BALLAL *et al.*, 2011; BAGAI *et al.*, 2012; CHANDEL *et al.*, 2012). Dessa maneira, a *Bertholletia excelsa* é uma fruta encontrada em diversos países da América do Sul e consumida tradicionalmente pela população. Os benefícios da *B. excelsa* são disseminados há anos e atualmente continuam tendo um apelo significativo entre os meios de comunicação e a população em geral. Entretanto, a confirmação da abundância dos componentes da mesma só foi descrita em 2004, sendo analisada sua rica composição mineral e protéica e, inclusive, os riscos de intoxicação por consumo elevado da fruta em função das altas concentrações de Selênio (CHUNIENG, 2004).

Por isso, a dose de *Bertholletia excelsa* (0,039 g/kg, equivalente ao consumo de duas Castanhas por dia no humano) foi escolhida na tentativa de garantir que os componentes pudessem influenciar na infecção, sendo equivalente a 5.0 µg de Selênio, 532 µg de Magnésio e 787 µg de Potássio, quantidades incapazes de provocar intoxicação pelo consumo. Assim, observamos que a administração de *B. excelsa* como pré tratamento durante 11 dias antes da inoculação do *Plasmodium berghei* foi suficiente para aumentar ligeiramente a sobrevivência (Figura 7), mantendo essa tendência durante a maior parte do período da infecção.

Em média, a sobrevivência dos animais pré tratados com *Bertholletia excelsa* foi de 15 dias. Cabe destacar que, apesar de ser um resultado discreto, possui grande relevância, se considerarmos que, no nosso trabalho, foi realizado unicamente um pré tratamento de 11 dias antes da inoculação do parasita, sem existir co-tratamento com uma droga antimalária tradicional (como é de praxe em estudos que utilizam fitoterápico com efeitos antimaláricos) (CACHET *et al.*, 2009; SHITUU *et al.*, 2011; BALLAL *et al.*, 2011; RAJAN & BAGAI, 2013). No nosso trabalho, o efeito do fruto foi o único responsável por essa ligeira melhoria. Assim, este resultado poderia apoiar a indicação da *B. excelsa* como adjuvante do tratamento para malária. Provavelmente, o efeito benéfico deste fruto será muito mais evidente quando usado em co-tratamento com drogas antimaláricas. Estudos adicionais estão sendo desenvolvidos para demonstrar essa hipótese.

O acompanhamento do peso dos animais do grupo P.b no 3º dia de infecção mostrou uma diminuição significativa (Figura 9), compatível com o aumento no nível de parasitemia neste mesmo dia (Figura 10). Diante deste dado, verificamos que os animais infectados sem pré tratamento perderam peso mais rapidamente em relação ao grupo Cast+P.b e demonstraram um nível maior de parasitemia em relação a esse mesmo grupo (Figura 10), neste mesmo período de análise. A diminuição do consumo alimentar é uma condição fortemente associada como sintoma de infecções crônicas, sendo a causa principal da acentuada perda de peso e um indicativo da gravidade da doença (MATTHYS & BILLIAU, 1997).

Todavia, administração de *Bertholletia excelsa* no grupo pré tratado, influencia positivamente mantendo o peso dos animais até o 10º dia de infecção (Figura 9). Esta marcada proteção também se mantém em relação ao nível de parasitemia (Figura 10), que foi evidentemente inferior em relação ao grupo P.b, até 16 dias após a inoculação do *Plasmodium*. Assim, presumimos que o reforço nutricional com a *B. excelsa* implicou na manutenção do peso dos animais até o décimo dia, mas o longo período sem administração não foi suficiente para manter o peso diante da progressão da infecção.

As extensões sanguíneas feitas durante a progressão da infecção foram avaliadas como células parasitadas todas aquelas hemácias que mostravam formas variadas do parasita (formatos puntiformes na extremidade da hemácia e formatos em anel), equivalente às diferentes fases do desenvolvimento do *Plasmodium*. As porcentagens de células infectadas (parasitemia) encontradas no nosso trabalho (Figura 10) foram semelhantes ao que já foi descrito na literatura para o mesmo modelo, alcançando perto de 10% no décimo dia de infecção (BALLAL *et al.*, 2011).

Interessantemente, o pré tratamento com *Bertholletia excelsa* foi capaz de influenciar esse parâmetro definitivamente de forma que no décimo dia de infecção foi detectada uma redução de 37,5% na parasitemia em relação ao grupo infectado e sem pré tratamento. Essa redução na parasitemia pode estar baseada na composição da *B. excelsa*. Entretanto, são necessários mais estudos para poder levantar uma hipótese sobre os possíveis mecanismos moleculares associados a essa proteção.

No desenvolvimento da doença, as hemácias parasitadas são intensamente danificadas, de forma que uma complicação característica da malária são as alterações dos parâmetros clínicos hematológicos. Assim, as análises hematológicas (plaquetas, hematócrito, hemoglobina, hemácias e leucócitos) são marcadores fundamentais para verificação da gravidade da infecção.

Neste trabalho, as análises bioquímicas, hematológicas e pesagem dos órgãos foram quantificadas no 10º dia de infecção, uma vez que foi mostrado que nesse momento a porcentagem de parasitemia detectada foi significativamente afetada pelo pré tratamento com o fruto, assim como os animais apresentavam um melhor aspecto (ericação de pelo, força nos membros, palidez) em relação àqueles infectados e não pré tratados (dados não mostrados).

Dentro das análises hematológicas, os valores das médias das contagens de plaquetas tenderam a diminuir nos grupos infectados (Figura 11), embora as diferenças entre os grupos experimentais não fossem significativas no teste ANOVA. Entretanto, quando foram selecionados unicamente dois grupos (controle e P.b ou controle e Cast+P.b) e realizado o teste t de Student foi possível observar significância ($P < 0,05$) em relação ao controle.

A atividade de plaquetas está ligada principalmente aos mecanismos imunológicos, tendo suas funções relacionadas à expressão de receptores que se ligam a moduladores de resposta imunológica do hospedeiro (anticorpos) e até expressão de moléculas capazes de influenciar no desenvolvimento de resposta imunitária adaptativa (MC MORRAN *et al.*, 2013). A diminuição de plaquetas é uma alteração comumente encontrada na malária, entretanto algumas hipóteses são descritas como causas dessa plaquetopenia. Dentre elas, a tentativa de proteger o hospedeiro durante a infecção, uma vez que as plaquetas seriam ativadas desde o início da infecção, reduzindo a velocidade de crescimento dos parasitas, tendo sua redução relacionada ao envolvimento direto destas nos processos imunológicos. (MC MORRAN *et al.*, 2013).

Em nosso trabalho, a maioria dos valores de análise hematológica se encontraram abaixo dos valores do controle. Percebemos no nosso estudo uma diminuição nos valores de porcentagem do hematócrito nos grupos infectados (Figura 14), compatível com o que fora descrito na literatura em ensaios que utilizaram modelos de infecção em ratos e camundongos

(SHIDA, 1989; SHITUU, 2011; BALLAL *et al.*, 2011). Esses dados confirmam a anemia como quadro frequente na malária, em função do ciclo eritrocítico do *Plasmodium* que irá provocar a hemólise das células, diminuindo a contagem das mesmas, determinada através de bioimpedância.

O pré tratamento com a *Bertholletia excelsa* não pareceu proteger o nível de hematócrito perante o efeito do parasita (Figura 14). Entretanto, cabe lembrar que no momento da medida do hematócrito, fazia já 10 dias que os animais não recebiam a suplementação com o fruto, sendo que a influência do metabolismo acelerado dos animais poderia ter resultado na diminuição da proteção para esse parâmetro.

A infecção com o *Plasmodium berghei* também provocou redução na contagem de hemoglobina e hemácias totais (Figura 13 e 12). Nossos resultados em relação ao nível de hemoglobina no grupo P.b corroborou com a diminuição verificada no trabalho de Ballal e colaboradores (2011), de forma que esse parâmetro encontra-se fortemente associado ao hematócrito. Concomitantemente, essa diminuição pode ser atribuída à hemólise excessiva presente na infecção. O rompimento dessas células resulta em liberação do parasita e esse antígeno irá iniciar o processo de resposta imunológica, gerando recrutamento das células de defesa (BALLAL *et al.*, 2011).

Nesse sentido, verificamos o aumento do número de leucócitos no plasma nos grupos infectados em relação ao grupo controle (Figura 15). Esse achado veio confirmar os dados de fluorescência anteriormente encontrados (LACERDA-QUEIROZ *et al.*, 2011), que apontaram para um aumento da aderência de leucócitos durante a resposta inflamatória causada pela infecção com *Plasmodium berghei* em animais BALB/c.

Nossos dados reforçam assim a hipótese de que com a ruptura de um eritrócito infectado, a atividade de células do sistema imunológico aumentaria com o objetivo de conter a ação do parasita livre para infectar novas células. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas com o pré-tratamento de *B. excelsa* entre os grupos inoculados com o parasita, é importante lembrar que essa medida foi realizada quando os animais estavam há 10 dias infectados, bem como 10 dias que tinham recebido a última dose de *Bertholletia excelsa*. Assim, talvez uma proteção temporária possa ter acontecido no início da infecção, que não pode ser registrada depois da evolução da infecção.

Nossa hipótese está baseada em dados preliminares realizados em nosso laboratório, com um desenho experimental diferente, onde os animais recebem *Bertholletia excelsa* por 7 dias antes da inoculação e por 7 dias depois da inoculação do parasita. Com esse desenho experimental, encontramos que o tratamento com a *Bertholletia excelsa* provoca um efeito protetor evidente de forma que houve uma redução de 47% da contagem do número de leucócitos totais dos animais submetidos ao tratamento em relação aos leucócitos dos animais do grupo P.b.

Curiosamente, como discutido acima, esse tratamento com *B. excelsa* não afetou significativamente os dados de hematócrito, hemoglobina e hemácias totais em relação ao grupo inoculado com o parasita, sendo um indicativo de que essas células continuam a sofrer hemólise liberando o parasita. Entretanto, a *B. excelsa* parece estar exercendo uma proteção adicional que evita que esse parasita liberado ative tão expressivamente o sistema imunológico. Experimentos adicionais com marcadores imunológicos serão necessários para confirmar essa hipótese e esclarecer possíveis mecanismos moleculares.

Apesar das alterações hematológicas registradas, a malária é uma doença de comprometimento sistêmico, podendo interferir na atividade de vários órgãos entre os que se destacam o fígado e o baço por serem intensamente acometidos desde o início da infecção (TUTEJA, 2007). Esses órgãos possuem um papel central no ciclo biológico do parasita, uma vez que ainda sob forma de esporozoíto, o parasita penetra no fígado, por um mecanismo não muito esclarecido, se reproduzindo e provocando a ruptura do hepatócito, que viabiliza a penetração do parasita nas células do sangue (TUTEJA, 2007). As atividades do sistema imunológico contra o parasita exigem a ação do baço, que é um órgão que possui um papel essencial no controle da parasitemia, tanto no sentido de remover hemácias infectadas com o parasita, quanto em relação à produção de células imunológicas (NEGREIROS *et al.*, 2009).

Assim, alterações de tamanho e formato do baço e fígado são frequentes na malária e, inclusive, um sinal clínico da doença por conta da dilatação dos quadrantes superiores do abdômen. Um estudo realizado no Sudão demonstrou alterações de tamanho do fígado e baço em pacientes positivos para o *Plasmodium falciparum*, correlacionando esse aumento dos órgãos à atividade imunológica destes (ALKADAROU *et al.*, 2013).

Deste modo, através da pesagem desses órgãos, nosso trabalho demonstrou que a administração da *B. excelsa* a como pré tratamento influenciou na diminuição dos valores

médios de peso destes, principalmente do baço, que foi muito significativo (Figuras 16, 17, 18 e 19).

A dissecação do fígado demonstrou evidente hepatomegalia nos grupos infectados (Figura 16), confirmando a alta atividade do parasita nesse órgão. Assim, a ausência de diferença significativa entre os grupos infectados seria explicada em função da grande exposição do fígado à atividade do *Plasmodium* (primeiro órgão acometido no processo infeccioso).

Por outro lado, o baço como responsável em reconhecer e remover eritrócitos defeituosos, também tem um papel fundamental na produção de células do sistema imunológico. A retirada do baço em animais infectados com *P. berghei* gerou uma acentuada diminuição da atividade de linfócitos B, apoiando a função do baço no controle da parasitemia (NEGREIROS *et al.* 2009). Na malária, essa função vê-se comprometida devido ao esforço exacerbado que esse órgão realiza na tentativa de diminuir a quantidade de hemácias anormais ou hemolisadas, assim como respostas imunológicas anormais, que, finalmente, provocam esplenomegalia (ALKADAROU *et al.*, 2013).

Neste trabalho, verificamos que a alteração no tamanho do baço do grupo pré tratado com *Bertholletia excelsa* foi significativamente inferior ao que foi medido nos animais infectados sem pré tratamento (Figura 16). A *B. Excelsa* teria a capacidade de proteger o baço das alterações causadas pelo *Plasmodium berghei*, sugerindo menor atividade do sistema imunológico, de forma que este órgão não seria tão afetado pela infecção diminuindo assim a resposta gerada diante da infecção.

Junto com as alterações hematológicas associadas ao diagnóstico da malária, as análises bioquímicas das enzimas são marcadores importantes para determinar o diagnóstico diferencial do funcionamento do fígado, verificando como o parasita interferiu nesse órgão.

Uma vez que a atividade de proliferação do *Plasmodium* inicia no hepatócito, as perturbações no fígado são bastante evidentes. Como esperado, nossos resultados demonstraram aumento significativo das transaminases no soro (Figura 20, 21 e 22). Essa elevação é frequente durante uma infecção aguda que resulta em necrose das células hepáticas, caracterizando assim as alterações hepáticas.

Embora, através da análise bioquímica, não foi registrada nenhuma proteção significativa no nível de AST associada ao pré tratamento (Figura 20), podemos verificar uma redução evidente da enzima ALT nos animais submetidos ao pré tratamento com *Bertholletia excelsa* em relação ao grupo P.b ($133\pm 1,9$ U/L e $124\pm 1,7$ U/L, respectivamente). Trabalhos outros que demonstram efeito antimalárico de compostos homeopáticos, como o Nosode, apresentam diminuições quantitativamente semelhantes para essa enzima, confirmando o potencial terapêutico do nosso fruto (BAGAI *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que ao mesmo tempo que a AST está presente em muitos órgãos, a ALT é encontrada principalmente no fígado. Portanto, a proteção que seria feita pela *B. excelsa* estaria sendo evidenciada principalmente no nível de ALT e não no de AST como acontece nos nossos resultados. Experimentos adicionais aumentando o número de animais em cada grupo estão sendo realizados para verificar se de fato existiria diferença no nível de AST com o consumo do fruto.

Tal como fora verificado para a AST, nossos dados em relação à atividade de GGT também demonstraram uma proteção significativa com o pré tratamento com *Bertholletia excelsa* (Figura 22). Esta enzima é essencial para a caracterização de doenças hepáticas inflamatórias e tóxicas.

Apesar das limitações inerentes a um estudo pioneiro como este, no qual praticamente não existem dados prévios nos que se basear para realizar um desenho experimental mais adequado que releve definitivamente uma proteção expressiva da *Bertholletia excelsa* na malária, nossos dados demonstraram que o tratamento com este fruto já estaria exercendo uma proteção significativa em relação a alguns dos parâmetros medidos como a sobrevivência dos animais, os níveis de parasitemia e leucócitos totais, o peso do baço e as enzimas hepáticas ALT e GGT.

Cabe ressaltar a importância dos resultados do presente trabalho, especialmente considerando que essa proteção se deveu única e exclusivamente ao efeito da *B. excelsa* e não ao efeito do fruto associado a uma droga antimalárica tradicional como é o caso de muitos estudos realizados com fitoterápicos quando querem demonstrar efeitos antimaláricos.

O conhecimento gerado da presente pesquisa apoia o uso da *Bertholletia excelsa* e começa a esclarecer os processos subjacentes de proteção.

7 CONCLUSÃO

- Confirmação científica do uso tradicional da *Bertholletia excelsa* como fitoterápico capaz de amenizar os sintomas clínicos causados na infecção por *Plasmodium berghei*.
- Suplementação da dieta com uma fruta encontrada em larga escala na Amazônia para influenciar em um quadro de infecção frequente na Amazônia.

8 REFERÊNCIAS

ALKADAROU T., MUSA A., ALKADAROU A., MAHFOUZ M.S., TROYE-BLOMBERG M., ELHASSAN A.M., ELHASSAN I.M. Immunological Characteristics of Hyperreactive Malarial Splenomegaly Syndrome in Sudanese Patients. **Journal of Tropical Medicine**. P. : 1-5. 2013.

AMINO R., THIBERGE S., BLAZQUEZ S., BALDACCI P., RENAUD O., SHORTE S. Imaging malaria sporozites in the dermis of the mammalian host. **Nature Protoc**. Vol ;2(7). Pp 1705-12. 2007.

AMPE C.; VAN DAMME J.; CASTRO L.A.B.; JOST M.; SAMPAIO A.M.; VAN MONTAGUE M.; VANDERKERCKHOVE J. The amino-acid sequence of the 2s sulphur-rich proteins from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **European Journal of Biochemic**. Vol 159. Pp 597-604. 1986.

BAGAI U., RAJAN A., KAUR S. Antimalarial potential of Nosode 30 and 200 against *Plasmodium berghei* infection in BALB/c mice. **Journal Vector Borne Disease**. Vol 49 pp. 72–77. 2012.

BAKER D.A. Malaria gamatocytogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Vol 172. Pp 57-65, 2010.

BALLAL A., BOBBALA D., QADRI S.M., FOLLER M., KEMPER D., NASIR O., SAEED A., LANG F. Anti-malarial effect of gum arabic. **Malaria Journal**. Vol 10:139. 2011.

BHALLA, A.; SURI, V.; SINGH, V. Malarial hepatopathy, **Journal postgrad Med**. Vol 52 (4). Pp 315-20. 2006

BOTSARIS A.S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. Vol 3:18. 2007.

BRASIL,MINISTERIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**.1. ed.Brasilia, 7 p. 2010.

CACHET N., HOALWIE F., BERTANI S., DEHARO E., STIEN D., HOUEL E., GORNIZKA H., FILLAUX J., CHEVALLEY S., VALENTIN A., JULLIAN V. Antimalarial Activity of Simalikalactone E, a New Quassinoid from *Quassia amara*L. (Simaroubaceae). **Antimicrobial agents and chemotherapy**. Vol : 53(10): Pp 4393-4398. 2009.

CHANDEL S., BAGAI U., VASHISHAT N. Antiplasmodial activity of *Xanthium strumarium* against *Plasmodium berghei*-infected BALB/c mice. **Parasitology Research**. Vol. (110). Pp 1179–1183. 2012.

CHUNHIENG T.; TRITIS K.P.; ELFAKIR C.; BROCHEIR J.; GOLI T.; MONTET D. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal Agriculture. Food Chemich.** V 52. Pp 4318-4322. 2004.

CLARK, I.A.; AL, YAMAN F.M.; JACOBSON, L.S. The biological basis of malarial disease. **International Journal for Pasitology.** Vol 27 (10). Pp. 1237-1249. 1997.

COELHO-FERREIRA M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethopharmacology.** Pp 159-75. 2009.

COURA R., SUAREZ-MUTIS M., LADEIA-ANDRADE S. A new challenge for malária control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection—a review. **MemInstOswaldo Cruz.** Vol 101(3). Pp 229-37. 2006 .

COTRAN R.S., KUMAR V., COLLINS T. Robbins. **Patologia estrutural e funcional.** Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. Pp 350. 2000.

DOOLAN D.L., DOBAÑO C., BAIRD J.K. Acquired immunity to malaria. **ClinMicrobiol Rev.** Vol 22(1). Pp 13-36. 2009.

EJIGIRI I., SINNIS P. Plasmodium sporozite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. **CurrOpinMicrobiol.** Vol 12(4). Pp 401-7. 2009.

FENG Y., ZHU X., WANG Q., JIANG Y., SHANG H., CUI L., CAO Y. Allici enhances host pro-inflammatory immune responses and protects against acute murine malaria infection. **Malaria Journal.** Vol 11:268. 2012.

FREITAS-SILVA O.; VENÂNCIO A. Brazil nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International.**V 44. Pp 1434–1440. 2011.

GOOD, M.F. Identification of Early Cellular Immune Factors Regulating Growth of Malaria Parasites in Humans. **Immunity.** Vol 23. Pp 241-244. 2005.

HALDAR K., MURPHY F.C., MILNER D.A., TAYLOR T.E. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. **Annual Review of Pathology.** Vol 2. Pp 217-49. 2007.

HUNT N.H., GOLENSER J., CHAN-LING T., PAREKH S., RAE C., POTTER S., MEDANA I.M., MIU J., BALL H.J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology.** Vol 36. Pp 569-582, 2006.

IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2009/pevs2009.pdf> (2009).

KATZUNG B.G. **Farmacologia básica e clínica.** São Paulo. p767-777. 2008.

LACERDA-QUEIROZ N., LIMA O.C.O., CARNEIRO C.M., VILELA M.C., TEIXEIRA A.L., TEIXEIRA-CARVALHO A., ARAÚJO M.S.S., MARTINS-FILHO A.O., BRAGA E.M., CARVALHO-TAVARES J. Plasmodiumberghei NK65 induces cerebral leukocyte recruitment in vivo: An intravital microscopic study. **ActaTropica**. Vol 120. Pp 31– 39. 2011.

LAMB T. J., BROWN D.E., POTOČNIK A.J., LANGHORNE, J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert review in molecular medicine**. Vol 24 (8). 2006.

LANGHORNE J. **Immunology and immunopathogenesis of malaria**. London: Springer. Pp 109-113. 2005.

LEMIRE M., FILLION M., BARBOSA JR F., GUIMARAES J.R.D., MERGLER D. Elevated levels of selenium in the typical diet of Amazonian riverside populations. **Science of the Total Environment**. Vol 408.Pp 4076–4084. 2010.

LEMIRE M., MERGLER D., FILLION M., PASSOS C.J.S., GUIMARÃES J.R.D., DAVIDSON R., LUCOTTE M. Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. **Science of the Total Environment**. Vol. 366. Pp 101– 111. 2006.

LEMIRE M., MER MERGLER D., HUEL G., PASSOS C.J.S., FILLION M., PHILIBERT A., GUIMARÃES J.R.D., RHEAULT I., BORDUAS J., NORMAND G. Biomarkers of selenium status in the amazonian context: Blood, urine and sequential hair segments Biomarkers of Se status in the Amazonian contex. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**. Vol 19.Pp 213-222. 2009.

MARTINS Y.C., CARVALHO L.J.M., DANIEL-RIBEIRO C.T. Challenges in the determination of early predictors of cerebral malaria: lessons from the human disease and the experimental murine models. **Neuroimmunomodulation**. Vol 16. Pp 134-145. 2009.

MATTHYS P., BILLIAU A. Cytokines and cachexia. **Nutrition**. Vol 13(9). 1997.

MCMORRAN B.J., BURGIO G., FOOTE S.J. New insights into the protective power of platelets in malaria infection. **Communicative&IntegrativeBiology** . Vol 6:3. 2011.

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

MIRABELLO L., CONN J.E. Molecular population genetics of the malaria vector Anopheles darlingi in Central and South America. **Heredity**. Vol96(8). Pp 311-21. 2006

MOTA M.M., PRADEL G., VANDERBERG J.P., HAFALLA J.C., FREVERT U. NUSSENZWEIG R.S., NUSSENZWEIG V., RODRIGUEZ A. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. **Science** 291, 141–144. 2001.

NEGREIROS R.M.A., MAKIMOTO F.H., SANTANA L.L.O., FERREIRA L.C.L., NAKAJIMA G.S., SANTOS M.C. Experimental splenectomies and malaria in mice. *Acta Cirúrgica Brasileira - Acta Cir Bras.* [serial on the Internet] Vol 24(6). 2009.

RAJAN A., BAGAI U. Antimalarial potential of China 30 and Chelidonium 30 in combination therapy against lethal rodent malaria parasite: *Plasmodium berghei*. **Journal Complement Integr Med.** Vol 10(1). Pp 1–8. 2013.

RETIEF F., CILLIERS L. Periodic pyrexia and malaria in Antiquity. **S Afr Med J.** Vol 96(8). Pp 684, 586-688.2006.

REY L. Malária: Os Plasmódios Humanos. **Bases da Parasitologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 106-114.1992.

SCOLES, R., GRIBEL, R.The regeneration of Brazil nut trees in relation to nut harvest intensity in the Trombetas River valley of Northern Amazonia, Brazil. **Forest Ecology and Management.**Vol 265.Pp 71–81. 2012.

SHIDA K.K., LEWCHALERMVONGSE B., PANG L.W. *Plasmodium berghei*: Malaria infection causes increased cardiac output in rats, *Rattus rattus*. **Experimental Parasitology** Vol 68(3).Pp 253- 259. 1989.

SHITUU I., EMMANUEL A., NOK A.J. Antimalaria Effect of the Ethanolic Stem Bark Extracts of *Ficusplatyphylla* Del. **Journal of Parasitology Research.**Article ID 618209. 2011.

SILVIE O., MOTA M. M., MATUSCHEWSKI K., PRUDENCIO M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host.**CurrOpinMicrobiol.** Vol 11(4). Pp 352-9. 2001.

SMITH N.P., MORI S.A., PRANCE, G.T. 2012. *Lecythidaceae*in **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [Acesso em 05 de novembro de 2012]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB023424>.

SIVEP/MALARIA. **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – Notificação de Casos de Malária.** Relatórios. Resumo epidemiológico, Região Malária. Ministério da Saúde. DATASUS. [Acesso em 05 de novembro de 2012]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_malaria_2010_2011.pdf

STURM A., AMINO, R., VAN DER SAND C., REGEN T., RETZLAFF S., RENNENBERG A., KRUEGER A., POLLOK J.M., MENARD R., HEUSSLER

V.T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science** . Vol 313. Pp 1287–1290. 2006.

TUTEJA R. Malaria – an overview. **The FEBS Journal** Vol 274. Pp 4670–4679. 2007.

VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethopharmacology**. Vol 98. Pp 351-360. 2005.

WORLD MALARIA REPORT 2009/WHO – World Health Organization. WHO Library Cataloguin in Publication Data. World Malaria Report 2009. World Health Organization, 260 p. ISBN 978 92 4 156390 1 (NLM classification: WC 765). Disponível em: <http://www.who.int>

WORLD MALARIA REPORT 2010/WHO – World Health Organization. WHO Library Cataloguin in Publication Data. World Malaria Report 2010. World Health Organization, 78 p. ISBN 978 92 4 156390 1 (NLM classification: WC 765). Disponível em: <http://www.who.int>

WORLD MALARIA REPORT 2011/WHO – World Health Organization. WHO Library Cataloguin in Publication Data. World Malaria Report 2011. World Health Organization, Organization, 278p. ISBN 978 92 4 156440 3 (NLM classification: WC 765). Disponível em: <http://www.who.int>