



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

EFEITO PROTETOR DA RAÇÃO ENRIQUECIDA COM AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) NO QUADRO DE MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

MARJORIE LUJAN MARQUES TORRES

BELÉM/PA

2018

MARJORIE LUJAN MARQUES TORRES

EFEITO PROTETOR DA RAÇÃO ENRIQUECIDA COM AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) NO QUADRO DE MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

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

Orientador: Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira.

BELÉM/PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- T693e Torres, Marjorie Lujan Marques
EFEITO PROTETOR DA RAÇÃO ENRIQUECIDA COM AÇAÍ (Euterpe oleracea) NO QUADRO DE MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL / Marjorie Lujan Marques Torres. — 2018
100 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista
Coorientação: Profa. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira.
1. Malária, Plasmodium berghei (PbA), Euterpe oleracea, Açaí, malária cerebral experimental, protocolo SHIRPA.. I. Batista, Evander de Jesus Oliveira , *orient.* II. Título
-

CDD 614.53209811

MARJORIE LUJAN MARQUES TORRES

EFEITO PROTETOR DA RAÇÃO ENRIQUECIDA COM AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) NO QUADRO DE MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

Orientador: Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira.

Dissertação de mestrado aprovada em 17 de maio de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva.
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ (UFPA)

Prof. Dr. Alan Barroso Araújo Grisólia
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ (UFPA)

BELÉM/PA

2018

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

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação,
aos meus pais, Raúl Torres e Thiana Marques.
Pelo incentivo, carinho e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora de Nazaré, por todas as bênçãos e graças alcançadas.

A minha mãe, Thiana Marques, pelo amor, incentivo, companheirismo e dedicação diária. Obrigada por ser meu exemplo de fé e conquista.

Ao meu pai, Raúl Torres e ao meu irmão Guido, que, apesar da distância, nunca deixaram de me apoiar emocionalmente e demonstrar o grande orgulho que sentem por mim.

Ao meu pai-drasto, Fernando Furtado, pela ajuda, conselhos, contribuições e carinho incondicional. Obrigada por ceder o açai do Sítio Santa Fé, foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A toda minha família, principalmente a minha avó, Maria de Nazaré, minha prima Neyla e minha madrinha, Fátima Araújo, por todo o apoio moral e pela paciência que tiveram comigo.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista, por ter me aceitado como aluna, por ter acreditado no meu potencial e ter proporcionado os meios necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha coorientadora, Prof^a. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira, pelo constante apoio e dedicação para a realização deste trabalho.

Aos professores, Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira e Prof. Dr. Alan Barroso Araújo Grisólia, por todas as valiosas contribuições realizadas para o aprimoramento desta dissertação.

A Nayara Kauffmann, por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados. Minha eterna gratidão pela sua ajuda diária e principalmente por ter acreditado em mim.

As meninas do grupo da Malária, Larissa Medeiros, Nívia Mendes e Brenda Ataíde. Por toda a ajuda proporcionada, tanto para a realização dos

experimentos quanto para os dias de estudo. Agradeço infinitamente pela paciência e incentivo que recebi de vocês a cada dia de trabalho.

Aos colegas do LNE e ao Amarildo, por terem contribuído para a realização deste trabalho.

A FAPESPA, CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro.

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

Muito obrigada a todos.

“Al final del día podemos aguantar mucho
más de lo que pensamos que podemos”.
(Frida Kahlo)

RESUMO

A malária cerebral (MC) é uma das complicações mais severas atribuídas à infecção pelo protozoário *Plasmodium falciparum*, ganhando destaque nas taxas de mortalidade infantil em áreas endêmicas. Esta enfermidade apresenta uma patogênese complexa e ainda pouco elucidada, estando associada a alterações cognitivas, comportamentais e motoras. Visando ampliar os conhecimentos a respeito desta patologia e procurando os benefícios atribuídos ao consumo diário de antioxidantes, o principal objetivo deste trabalho é avaliar o possível efeito protetor do fruto da *Euterpe oleracea* (açai) durante a evolução do quadro de malária cerebral experimental (MCE) induzida em modelo murino por meio da inoculação da cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Para tal, utilizaram-se camundongos da linhagem albino suíço, os quais foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 10^6 de eritrócitos parasitados. Os animais (fêmeas e machos entre 4 a 6 semanas) foram divididos em quatro grupos, dentre os quais os grupos Açai e PbA+Açai foram mantidos com uma dieta exclusiva com ração enriquecida com açai, e aos grupos Controle e PbA foram proporcionadas somente ração padrão durante os 22 dias de experimento. Para caracterização do quadro de MCE foram avaliados diversos parâmetros como o surgimento dos sinais clínicos, curva de sobrevivência, parasitemia (%), ganho de massa corpórea e permeabilidade vascular. Para avaliação das alterações comportamentais e locomotoras dos animais foi utilizado o protocolo SHIRPA. Observamos prolongamento de sobrevivência dos animais infectados e tratados com dieta enriquecida com açai, além de diminuição das alterações neurológicas decorrentes da exposição do parênquima cerebral. Este trabalho nos permitiu validar o desenvolvimento do quadro de malária cerebral experimental (MCE) em modelo murino e avaliar o efeito neuroprotetor do açai (*Euterpe oleracea*) no decorrer da doença.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium berghei* (PbA), *Euterpe oleracea*, Açai, malária cerebral experimental, protocolo SHIRPA.

ABSTRACT

Cerebral malaria (CM) is one of the most severe complications attributed to protozoal infection by *Plasmodium falciparum*, gaining prominence in infant mortality rates in endemic areas. It's a complex pathogenesis and still little elucidated, being associated with cognitive, behavioral and motor changes. Aiming to broaden the knowledge about this pathology and looking for the benefits attributed to the daily consumption of antioxidants, the objective of this work is to evaluate the possible protective effect of *Euterpe oleracea* fruit (açai) during evolution of experimental cerebral malaria (ECM) induced in murine model by means of inoculation of *Plasmodium berghei* (PbA), ANKA stain. For this, we used the Swiss line, which were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 10^6 of parasitized erythrocytes. The animals (females and males between 4 and 6 weeks) were divided into four groups, among which Açai and PbA+Açai groups were maintained on a ration-exclusive diet enriched with açai and the Control and PbA groups were given only standard ration during 22 days of experiment. To characterize the ECM framework, several parameters were evaluated such as the appearance of clinical signs, survival curve, parasitemia, body mass gain and vascular permeability. The SHIRPA protocol was used to evaluate the behavioral and locomotor changes in animals. We observed an extension of survival of the infected animals and treated with a diet enriched with acai berry, and decreased the neurological changes arising from the exposure of the cerebral parenchyma. This work allowed us to validate the development of the experimental brain malaria framework in murine model and evaluate the neuroprotective effect of Acai (*Euterpe oleracea*) in the course of the disease.

Keywords: Malaria, *Plasmodium berghei* (PbA), *Euterpe oleracea*, Açai, experimental cerebral malaria, SHIRPA protocol.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa geográfico evidenciando as mudanças projetadas nos países que apresentam taxas de incidência de Malária, entre os anos de 2000-2015. Fonte: WHO database, 2015.....23
- Figura 2:** Gráfico de casos de malária notificados por estado e percentual de casos na região Amazônica, nos anos de 2017 e 2018 (nos meses de janeiro e fevereiro). Fonte: WHO database, 2018.....24
- Figura 3:** Desenho esquemático do ciclo evolutivo do *Plasmodium sp.* em seu hospedeiro vertebrado (homem), evidenciando os estágios evolutivos do parasita nas fases pré-eritocítica e eritocítica. Fonte: Adaptado de REGAN *et al.*, 201625
- Figura 4:** Desenho esquemático evidenciando a ativação da microglia e a redistribuição dos astrócitos. Fonte: Adaptado de ADAMS *et al.*, 2002.....30
- Figura 5:** Esquema ilustrativo demonstrando os mecanismos de citoaderência de eritrócitos parasitados, gerando obstrução do fluxo sanguíneo no quadro de malária cerebral 1) Expressão de moléculas de adesão, 2) Citoaderência, 3) Formação de rosetas, 4) Quebra da barreira hematoencefálica. Fonte: Adaptado de REGAN, *et al.*, 2016.....31
- Figura 6:** Foto das palmeiras *Euterpe oleracea* no Sítio Santa Fé, contendo os cachos com o fruto açaí. Fonte: Acervo pessoal.....35
- Figura 7:** Foto dos cachos de açaí para obtenção da polpa. Fonte: Acervo pessoal.....42
- Figura 8:** Mapa geográfico mostrando a localização do Sítio Santa Fé, de onde foram obtidos os frutos da *Euterpe oleracea*. Fonte: Google maps, 2018.....42
- Figura 9:** Foto da ração enriquecida com açaí. Fonte: Acervo pessoal.....43

Figura 10: Desenho esquemático de linha temporal, evidenciando o período de pré-tratamento, inoculação da cepa PbA e tratamento dos camundongos da linhagem albino suíço infectados.....	45
Figura 11: Avaliação de massa corpórea em camundongos albino suíços/ controles e infectados com a cepa ANKA de <i>Plasmodium berghei</i> (PbA). Grupos experimentais: Controle, PbA, PbA + Açaí e Açaí (n= 34 animais). Dados apresentados em Média±Erro Padrão; p<0.05.....	57
Figura 12: Curva de sobrevivência de camundongos albino suíço infectados com a cepa ANKA de <i>Plasmodium berghei</i> (PbA). Os animais foram inoculados com 10 ⁶ de eritrócitos parasitados, apresentando dois grupos experimentais: PbA e PbA + Açaí (n= 20 animais).....	58
Figura 13: Parasitemia de camundongos albino suíço infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10 ⁶ de eritrócitos parasitados, apresentando os grupos experimentais PbA e PbA + Açaí.....	59
Figura 14: Permeabilidade vascular. Apresentando diferença significativa entre os grupos PbA e Controle, PbA e PbA + Açaí (n=8). Dados expressos em média±EPM. *p<0.01 vs Controle, #p<0.01 vs PbA.....	60
Figura 15: Comprometimento comportamental após inoculação da cepa PbA para indução do quadro de Malária Cerebral Experimental (MCE). O comprometimento foi avaliado em cinco diferentes categorias funcionais: comportamento motor, tônus muscular e força, reflexo e função sensorial, estado neuropsiquiátrico e função autonômica utilizando a tabela primária do protocolo SHIRPA. A soma dos escores de todas as categorias foi registrada como uma pontuação total para cada grupo (n=10) e os dados estão expressos como média ± SEM. ANOVA de uma via com pós teste não paramétrico de Wilcoxon. *p<0.0001 PbA vs Controle. #p<0.0001 PbA vs PbA + Açaí.....	62

Figura 16: : Atividade locomotora dos grupos Controle, Açai, PbA e PbA + Açai, a partir do número de quadrantes cruzados no 3º, 5º, 7º e 9º dia pós-infecção (d.p.i.).....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos metabólicos da família <i>Aracaceae</i> . Fonte: Adaptado de NERI- NUMA <i>et al.</i> , 2017.....	38
---	----

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Diferenças clínicas entre crianças e adultos apresentando quadro de malária cerebral. Fonte: Adaptado de IDRO *et al.*, 2005.....29
- Quadro 2:** Organização dos grupos experimentais de acordo com o tratamento. **Plasmodium berghei* ANKA (PbA).....42
- Quadro 3:** Classificação das categorias funcionais e parâmetros avaliados no protocolo SHIRPA. Fonte: Adaptado de LACKNER *et al.*, 2006.....48
- Quadro 4:** Classificação e descrição dos parâmetros avaliados utilizando o protocolo SHIRPA, estabelecendo os devidos scores. Fonte: Adaptado de LACKNER *et al.*, 2006.....49

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang- 2 – Angiotensina 2

ANKA – ANtwepen-KAsapa

ANOVA – Análise de variância

BHE – Barreira Hematoencefálica

CEUA – Comissão de ética do uso de animais

C3G - Cianidina-3-glucosídeo

C3R - Cianidina-3-rutinosídeo

d.p.i. – Dias pós-infecção

EDTA – Ácido Diaminotetracético

ERO's - Espécies Reativas de Oxigênio

i.p. – Intraperitoneal

ICAM – Moléculas de Adesão Intercelular

IL-12 – Interleucina 12

IL -10 – Interleucina 10

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-6 – Interleucina 6

iNOS – Enzima Óxido Nítrico Sintase induzível

Kg - Quilograma

MC – Malária Cerebral

MCE - Malária Cerebral Experimental

MEC - Matriz Extracelular

mg – Miligrama

ml – Mililitro

MS – Ministério da Saúde

NAFLD – *Non-alcoholic fatty liver disease*

NF- κ B – Fator Nuclear kappa B

NO – Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – Metanol absoluto

Pb – *Plasmodium berghei*

PbA – Cepa ANKA de *Plasmodium berghei*

PBS – Phosphate Buffered Saline

PfEMP1 – Proteína de membrana do eritrócito 1 de *Plasmodium falciparum*

PIACM - Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária

PIC – Pressão Intracraniana

pRBCs – Eritrócitos Parasitados

SNC – Sistema Nervoso Central

TAG - Triacilglicerol

TNFR2 – Receptores de TNF- α tipo 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

UFPA - Universidade Federal do Pará

VCAM – Moléculas de Adesão Vasculares

VWF – Fator de Von Willebrand

WHO - World Health Organization

WPB – Corpus de Weibel-Palade

μ l - Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Considerações Gerais.....	22
1.2. Aspectos Clínico, Transmissão e Ciclo Biológico.....	25
1.3. Patogênese da Malária Cerebral.....	28
1.4. Modelos Experimentais em Malária Cerebral.....	33
1.5. <i>Euterpe oleracea</i> (Açaí).....	35
2. OBJETIVOS.....	40
2.1. Objetivo Geral.....	40
2.2. Objetivos Específicos.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1. Animais Experimentais	41
3.2. Ração enriquecida com polpa de açaí (<i>Euterpe oleracea</i>).....	41
3.3. Indução do Quadro de Malária Experimental	43
3.4. Grupos Experimentais e Tratamento com Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>).....	44
3.5. Caracterização de Malária Cerebral nos Grupos Experimentais.....	45
3.5.1. Massa Corpórea, Curva de sobrevivência e Parasitemia.....	45
3.6. Permeabilidade Vascular.....	46
3.7. Ensaio de Comportamento (Protocolo SHIRPA).....	47
3.7.1. Campo Aberto	56
3.7.2. Análise Estatística.....	56
4. RESULTADOS	57
4.1. Padronização e Efeito do açaí no quadro de malária cerebral (MC).....	57
4.1.1. Variação no ganho de massa corpórea.....	57
4.1.2. Curva de Sobrevivência e Sinais Clínicos.....	58
4.1.3. Parasitemia.....	59
4.1.4. Permeabilidade Vascular.....	60
4.1.5. Ensaio de Comportamento (Protocolo SHIRPA).....	60
4.1.6. Campo Aberto.....	63
5. DISCUSSÃO.....	64

6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO I.....	78
ANEXO II.....	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

A malária é uma doença parasitária de caráter endêmico, tendo como agentes etiológicos os protozoários do gênero *Plasmodium*, e sendo transmitida pelo mosquito fêmea (hematófaga) infectado pertencente ao gênero *Anopheles*. Existem cinco espécies de *Plasmodium* capazes de infectar os seres humanos, sendo eles os *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. Somente o *P. falciparum* é capaz de gerar o quadro de malária mais severo, enquanto que as outras espécies estão associadas ao desenvolvimento da forma mais branda da doença (ACTA PEDIÁTRICA PORTUGUESA, 2006; MIRANDA *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2008).

Esta enfermidade vem sendo descrita ao longo da história com altas taxas de morbidade e mortalidade e apresenta diversos sinônimos; Impaludismo, Febre Palustre, Febre Terçã, Febre Quartã e Maleita. O termo malária é oriundo do italiano medieval (“*mala aria*”), nome atribuído devido à associação das manifestações desenvolvidas com o ar contaminado presente em regiões ou terrenos alagados (HALDAR *et al.*, 2007). Apesar de estarem presentes em relatos antigos, foi somente no século XIX que registraram-se as primeiras observações de parasitas em indivíduos infectados, em decorrência da investigação científica realizada pelo médico francês Charles Louis Alphonse Laveran, o qual propôs que aquele protozoário seria o responsável por desenvolver a doença (TUTEJA, 2007).

Considerada como um relevante problema de saúde pública em mais de 100 países, dentre os quais destacam-se os pertencentes à África Tropical, Sudeste Asiático e América Latina (Figura 1), a malária atinge principalmente crianças menores de cinco anos (TUTEJA, 2007; MIRANDA *et al.*, 2010). Nos países da América do Sul, o Brasil encontra-se em destaque, tendo 99% dos casos registrados na região da Amazônia Legal, englobando os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, conforme observado na Figura 2 (MARTINS *et al.*, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2011; WHO, 2015, 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016), a malária é endêmica em regiões tropicais e subtropicais devido às características ambientais e habitacionais que favorecem seu desenvolvimento, tais como, temperatura elevada constante, chuva intensa e alta humidade, contribuindo assim, para a ocorrência de focos de água parada que propiciam a reprodução das larvas do mosquito. Esta enfermidade apresenta-se mundialmente distribuída, tendo áreas de transmissão concentradas principalmente nas regiões das Américas, África e Ásia.

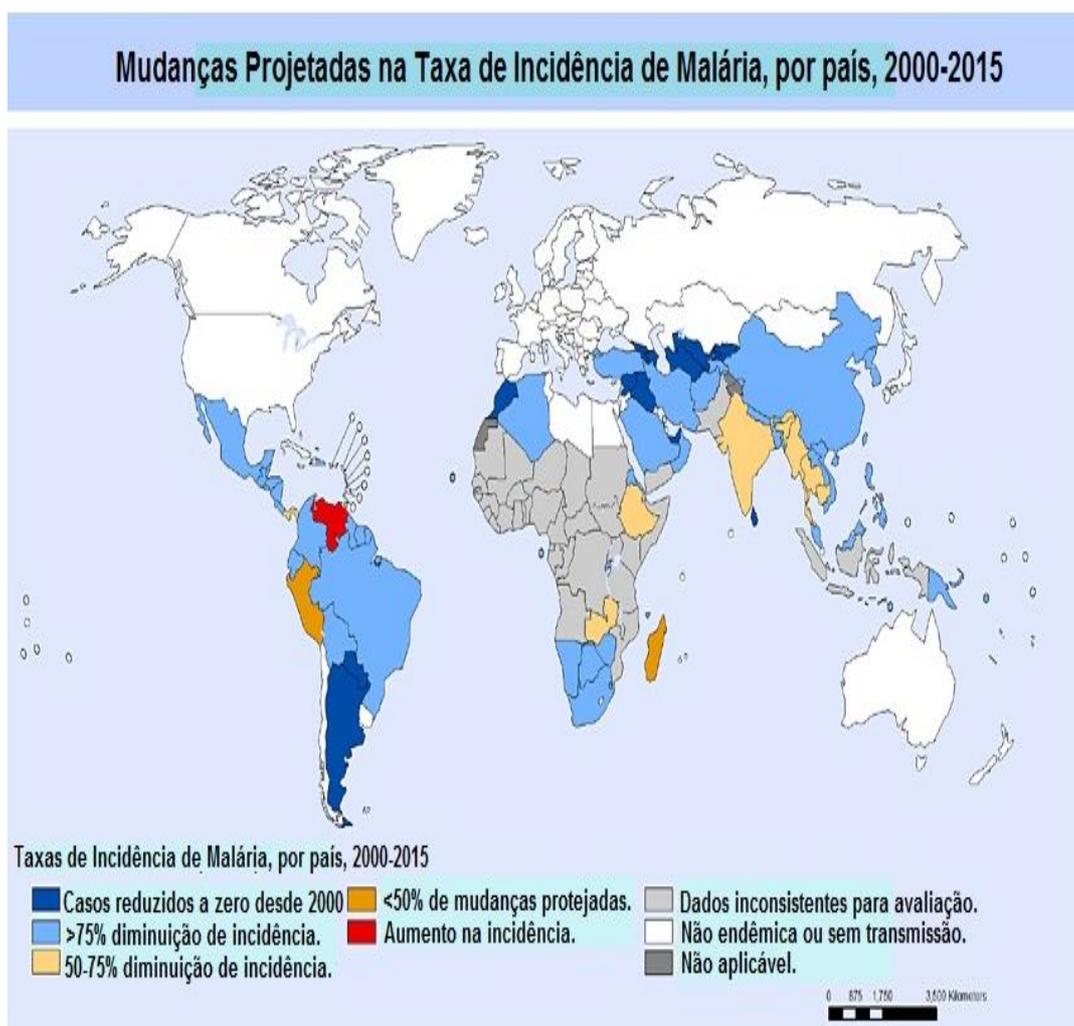


Figura 1: Mapa geográfico evidenciando as mudanças projetadas nos países que apresentam taxas de incidência de Malária, entre os anos de 2000-2015. Fonte: WHO database, 2015.

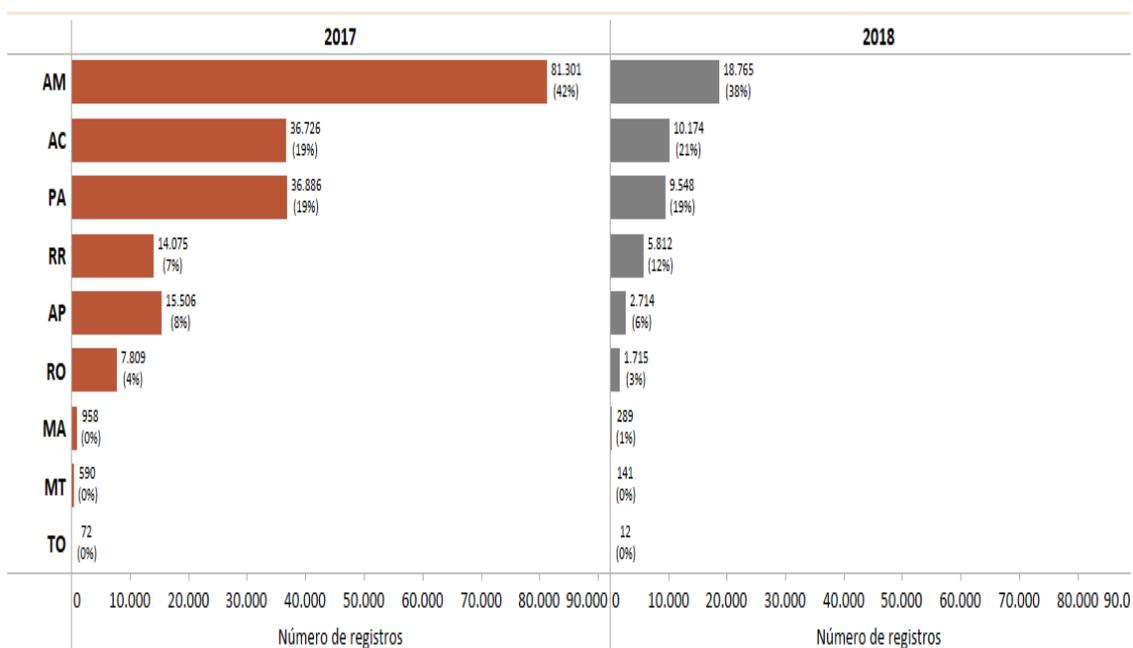


Figura 2: Gráfico de casos de malária notificados por estado e percentual de casos na região Amazônica, nos anos de 2017 e 2018 (nos meses de janeiro e fevereiro). Fonte: WHO database, 2018.

Com aproximadamente 200 milhões de novos casos e cerca de 445 mil mortes por ano, a malária ainda é uma doença infecciosa de extrema importância. No ano de 2017, o Brasil registrou 89% de casos ocasionados por *Plasmodium vivax*, e 11% por *Plasmodium falciparum*, tendo como principal vetor o *Anopheles darlingi*. Apesar de ser a minoria dos casos, um incremento no percentual atribuído ao *P. falciparum* é preocupante, haja vista que esta espécie desenvolve a doença na sua forma mais grave, podendo levar os indivíduos infectados a óbito (WHO, 2016; DUNST *et al.*, 2017; QUEIROZ *et al.*, 2008).

Segundo dados do Ministério da Saúde (MS, 2015), estima-se que 40% da população mundial está exposta ao risco de adquirir a doença. Por tanto, as campanhas de prevenção e de erradicação da doença, tais como o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), associadas ao tratamento adequado, são essenciais para o controle da disseminação desta enfermidade.

Os sinais e sintomas desenvolvidos durante a infecção por *Plasmodium falciparum* já se encontram bastante elucidados na literatura, destacando-se o

quadro mais severo, o desenvolvimento do quadro de malária cerebral (MC) (GOMES *et al.*, 2011). A patogênese da doença é bastante complexa, cujo mecanismo de ação gera um quadro de hipóxia cerebral e consequente quebra da barreira hematoencefálica (BHE), culminando na exposição do parênquima cerebral. Devido a este fato, são observadas alterações neurológicas, comportamentais e locomotoras nos indivíduos afetados (MEDANA *et al.*, 2001; HORA *et al.*, 2016).

A bateria de testes SHIRPA vem sendo utilizada como método complementar de avaliação de mudanças comportamentais evidenciadas durante a infecção por *Plasmodium falciparum* (e seu correspondente em modelo murino, o *Plasmodium berghei*), devido à sua capacidade de desenvolver o quadro de malária cerebral (MC). Os diversos parâmetros avaliados neste protocolo permitem rastrear o surgimento de sinais clínicos indicativos de alterações nas funções neurológicas básicas, podendo, por tanto, prever o surgimento da doença (PINTO *et al.*, 2013; ROGERS *et al.*, 2001).

1.2. Aspectos Clínicos, Transmissão e Ciclo Biológico

O ciclo evolutivo do *Plasmodium* é complexo, sendo dividido em duas fases desencadeadas em seus hospedeiros, intermediário e definitivo. A fase assexuada se desencadeia no ser humano, e está subdividida em duas etapas: uma pré-eritrocítica e outra eritrocítica; enquanto que a fase sexuada se desenvolve no hospedeiro invertebrado (mosquito) (BOYSEN *et al.*, 2013; HALDAR *et al.*, 2007).

Quando o indivíduo é infectado, através da inoculação do parasita durante a picada do mosquito, dá-se início ao ciclo. Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos migram para o fígado e infectam os hepatócitos, onde proliferam por 2 a 10 dias (dependendo da espécie), dando origem a vários merozoítos. Durante esse período, a infecção é assintomática e cada esporozoíto pode produzir cerca de 30.000 merozoítos por hepatócito infectado (MOTA *et al.*, 2001).

Os hepatócitos infectados se rompem e os merozoítos liberados retornam a corrente sanguínea, onde conseguem invadir as hemácias e iniciam a fase assexuada eritrocítica do ciclo. Nas hemácias, os merozoítos passam por 3 estágios evolutivos: anel (trofozoíto jovem), trofozoíto e esquizonte. O trofozoíto é formado pelo aumento atividade metabólica e pelo consumo do ferro da hemoglobina; enquanto que o esquizonte será formado após vários ciclos de divisão celular, podendo liberar aproximadamente 20 merozoítos na corrente sanguínea (MILLER *et al.*, 2002; TUTEJA, 2007; WHITE *et al.*, 2014).

Os merozoítos que não invadem os eritrócitos acabam se diferenciando em gametócitos: microgametócitos e macrogametócitos (fêmea e macho, respectivamente), os quais são formas infectantes para o vetor transmissor da doença. Os gametócitos que são ingeridos pelo mosquito *Anopheles* (durante o repasto sanguíneo) se fundem na parede do intestino do mosquito, formando o zigoto. Este zigoto possui a capacidade de evoluir para o estágio de oocistos durante um processo chamado de esporogonia. O oocisto se rompe e libera os esporozoítos, que migram até a glândula salivar do mosquito, sendo, por tanto, transmitidos ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, onde o ciclo se reinicia, conforme ilustrado na Figura 3 (EKSI *et al.*, 2006; BAKER *et al.*, 2010).

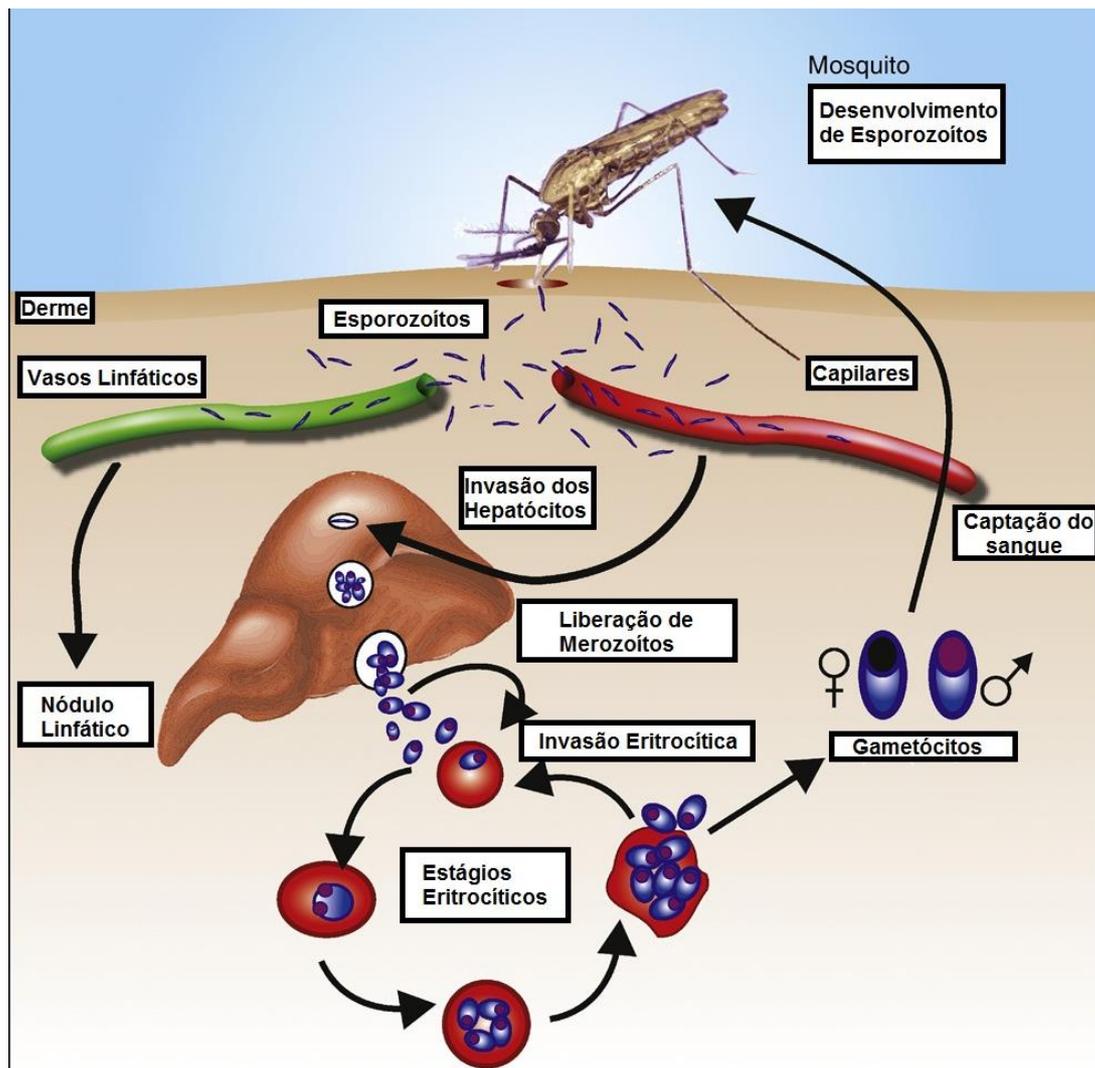


Figura 3: Desenho esquemático do ciclo evolutivo do *Plasmodium* sp. em seu hospedeiro vertebrado (homem), evidenciando os estágios evolutivos do parasita nas fases pré-eritocítica e eritrocítica. Fonte: Adaptado de REGAN *et al.*, 2016.

A patogênese desta enfermidade deve-se à multiplicação assexuada de estágios intra-eritrocíticos, gerando uma associação entre as respostas geradas tanto pelo parasita quanto pelo hospedeiro. Os sintomas clínicos desenvolvem-se em decorrência da ruptura das eritrócitos parasitados, já que ocorre a liberação de antígenos por parte do parasita, desencadeando uma resposta imunológica por parte do hospedeiro. Por tal motivo, os indivíduos infectados apresentam episódios febris, mal estar, cefaléia, dores abdominais, náuseas e vômitos (DE SOUZA & RILEY, 2002).

Quando o indivíduo é inoculado com a espécie *Plasmodium falciparum*, o quadro desenvolvido é considerado mais grave, gerando episódios de convulsões e coma, sendo estes, uma consequência do desenvolvimento do quadro de malária cerebral (MC). Esta forma da doença é de extrema importância, devido à sua gravidade e à maior probabilidade de levar o indivíduo infectado à morte (QUEIROZ *et al.*, 2008).

Apesar do constante progresso nas medidas de combate a doença, os esforços são dificultados pela resistência emergente do *Plasmodium* em resposta aos medicamentos antimaláricos, bem como a interrupção e demora na busca dos tratamentos utilizados.

1.3. Patogênese da Malária Cerebral

A malária cerebral (MC) é uma enfermidade ocasionada pela infecção por *Plasmodium falciparum*, manifestando-se principalmente por alterações do nível de consciência, episódios de crises epiléticas, alterações cognitivas e comportamentais, sendo, por tanto, responsável pela maioria dos casos de incapacidade e óbito (QUEIROZ *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2010). A MC manifesta-se de maneira diferente entre os indivíduos, mais precisamente entre as crianças e os adultos (IDRO *et al.*, 2005). Algumas das principais diferenças clínicas observadas são descritas no Quadro 1.

Manifestações Clínicas	Crianças	Adultos
Sinais Neurológicos	>30% associado a aumento de pressão intracraniana (PIC) ; alterações retinianas em >60%, edema cerebral em 40%.	Geralmente cursam com síndrome do neurônio motor superior.
Episódios de Crises Epilépticas	>60% apresentam episódios de crise epiléptica durante admissão hospitalar.	20% apresentam episódios de crises epilépticas.
Recuperação da Consciência	Rápida (24-28 horas após admissão hospitalar).	Lenta (48 horas após admissão hospitalar).
Coma	Desenvolvimento rápido, frequentemente após crises epilépticas.	Desenvolvimento gradual, após episódios de sonolência, desorientação, agitação (delírio) por 2 a 3 dias ou ocorrência de crises epilépticas.

Quadro 1: Diferenças clínicas entre crianças e adultos apresentando quadro de malária cerebral. Fonte: Adaptado de IDRO, *et al.*, 2005.

A patogênese da doença é desencadeada pelas respostas do parasita e do hospedeiro, incluindo a obstrução da barreira hematoencefálica (BHE), ativação e apoptose de células endoteliais, biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), ativação plaquetária e neuroinflamação (HORA *et al.*, 2016).

A BHE é uma estrutura formada por células endoteliais que ficam agrupadas nos capilares cerebrais, com permeabilidade altamente seletiva, o

que lhe atribui a capacidade de proteger o SNC de substâncias químicas presentes no sangue (MEDANA *et al.*, 2001; HORA *et al.*, 2016). Durante o quadro de MC, ocorre uma alteração nas propriedades da barreira, a qual perde sua capacidade de proteção e acaba gerando alterações estruturais e funcionais no parênquima cerebral. Estas alterações ocorrem em decorrência da entrada de citocinas, antígenos do parasita e células do sistema imune, gerando a ativação da microglia e a redistribuição dos astrócitos, conforme observado na Figura 4 (ADAMS *et al.*, 2002).

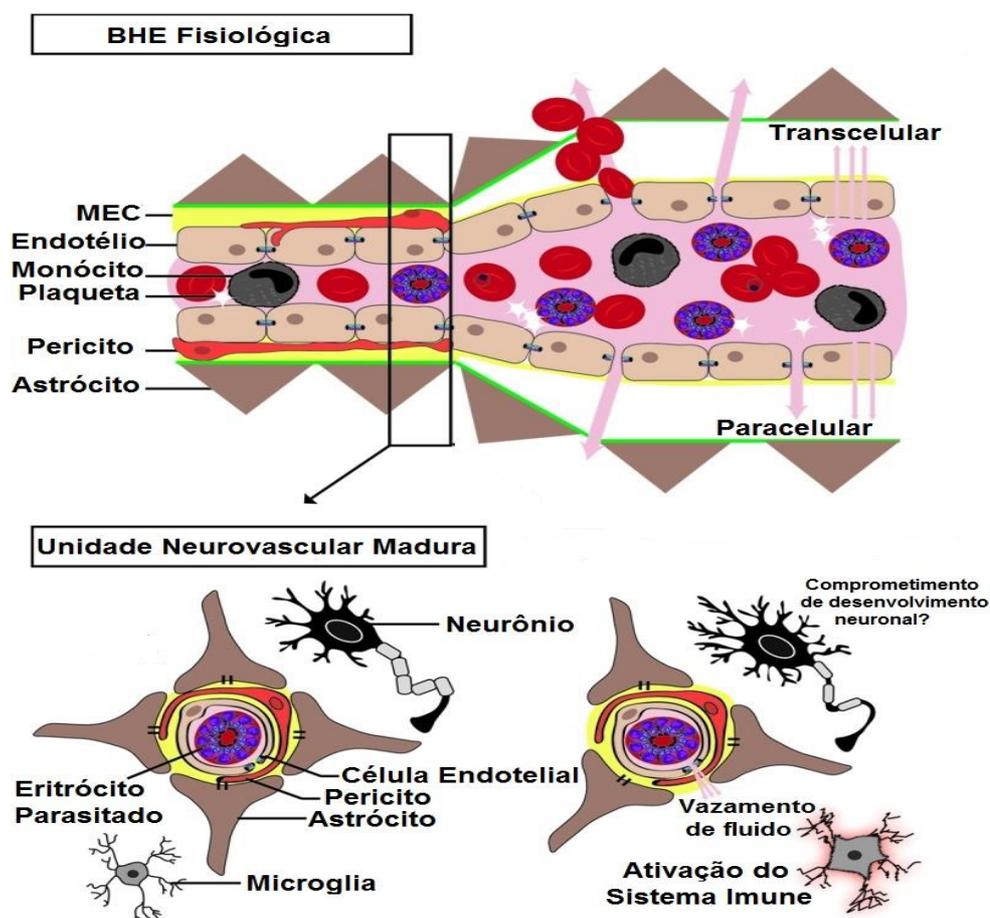


Figura 4: Desenho esquemático evidenciando a ativação da microglia e a redistribuição dos astrócitos. Fonte: Adaptado de ADAMS *et al.*, 2002.

Vários estudos tentam explicar o desenvolvimento do quadro de malária cerebral (MC), podendo ser compreendida por duas teorias: teoria da obstrução mecânica e teoria da resposta inflamatória exacerbada. A teoria da obstrução mecânica foi proposta no ano de 1894 por MARCHIAFAVA & BIGNAMI,

enquanto que a segunda teoria foi inicialmente proposta por MAEGRAITH no ano de 1948 (VAN DER HEYDE *et al.*, 2006; CLARK & ROCKETT, 1994).

A Figura 5 ilustra a hipótese da obstrução mecânica, a qual baseia-se no sequestro de hemácias (eritrócitos) parasitadas com as formas evolutivas de trofozoítos e esquizontes de *Plasmodium falciparum*, levando ao sequestro e à formação rosetas, respectivamente (GOMES *et al.*, 2011).

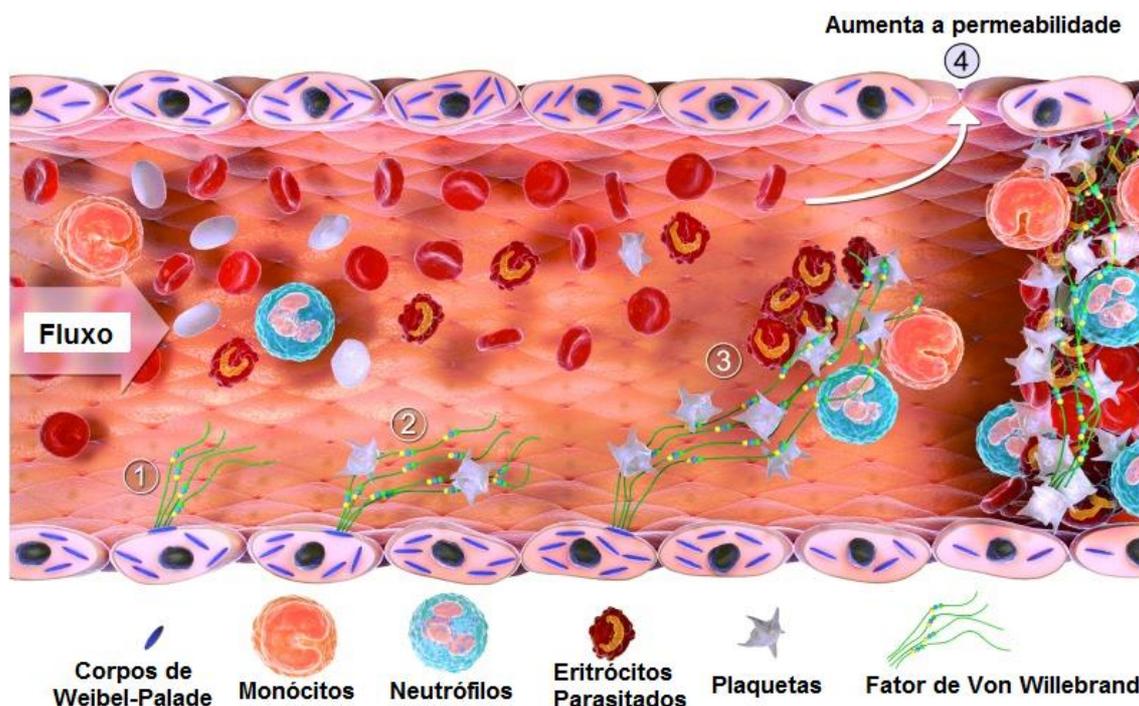


Figura 5: Esquema ilustrativo demonstrando os mecanismos de citoaderência de eritrócitos parasitados, gerando obstrução do fluxo sanguíneo no quadro de malária cerebral. 1) Expressão de moléculas de adesão, 2) Citoaderência, 3) Formação de rosetas, 4) Quebra da barreira hematoencefálica. Fonte: Adaptado de REGAN, *et al.*, 2016.

O endotélio ativado expressa uma variedade de moléculas de adesão, como por exemplo, os corpos de Weibel-Palade (WPB). Os WPB são vesículas que, ao aderirem à membrana das células epiteliais, são capazes de secretar o Fator de Willebrand (VWF), Angiotensina 2 (Ang-2) e P-selectina (MATSUSHITA, *et al.*, 2004; ARMAH, *et al.*, 2005). O VWF medeia a adesão das plaquetas ao endotélio, cujo acúmulo no local de sequestro de pRBCs e seu efeito pró-apoptótico dependente do contato com células endoteliais pré-estimuladas pelo TNF- α (HORA, *et al.*, 2016). As P-selectinas recrutam

leucócitos para o local da lesão, enquanto que as Ang-2 são moléculas responsáveis por aumentar a permeabilidade e facilitar a ativação endotelial (FIEDLER, et al., 2006).

Esses eventos resultariam na obstrução do fluxo sanguíneo, gerando anóxia no tecido cerebral, e, conseqüentemente, a diminuição da remoção de produtos residuais, o que poderia levar ao estado de coma, sintoma característico no quadro avançado de MC. O sequestro é resultado da ligação da PfEMP-1 (proteína de membrana 1 do eritrócito de *Plasmodium falciparum*), presente na membrana de eritrócitos parasitados (pRBCs), juntamente com os receptores das células endoteliais, tais como a molécula de adesão intercelular 1 (I-CAM 1) e a molécula de adesão vesicular 1 (V-CAM 1) (ARMAH *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2010).

Outra teoria que explica este quadro é a teoria da inflamação, ocasionada por uma resposta inflamatória exacerbada, sendo iniciada pela liberação de antígenos pelo protozoário *P. falciparum* associada à ativação de monócitos. Estes, irão secretar mediadores pró-inflamatórios, como Interleucinas, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Quimiocinas, os quais, juntamente com as citocinas pró-inflamatórias, agem recrutando os linfócitos CD4 e CD8. Este recrutamento acaba exacerbando o processo, promovendo o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (GOMES *et al.*, 2011).

As citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF encontram-se elevadas em episódios de MC, enquanto que os mediadores IL-2 e IL-10 (citocina anti-inflamatória) apresentam-se reduzidos no córtex frontal e no hipocampo (MIRANDA *et al.*, 2013). Por outro lado, a resposta inflamatória sistêmica e local gerada leva ao desenvolvimento de coagulopatias, disfunção de células endoteliais cerebrais, acúmulo de leucócitos na microcirculação cerebral, além de gerar alterações na BHE, vasoconstrição cerebral e edema (HORA *et al.*, 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017), estima-se que aproximadamente 20% dos indivíduos que desenvolvem o quadro de MC evoluem a óbito, e que 10 a 17% daqueles que sobrevivem apresentam déficits neurológicos, inclusive após receberem tratamento adequado. Entre as

alterações clínicas persistentes destacam-se os déficits motores (ataxia, hemi ou quadriparesia), as alterações sensoriais (visuais e auditivas) e os transtornos cognitivos (memória, linguagem, atenção) (MIRANDA *et al.*, 2010).

1.4. Modelos Experimentais em Malária Cerebral (MCE)

Modelos experimentais *in vivo* utilizando roedores são de grande relevância na pesquisa uma vez que os modelos murinos são capazes desenvolver sinais clínicos similares aos gerados nos seres humanos, com respostas imunológicas e sinais semelhantes aos observados em infecções por *Plasmodium falciparum* (LOU *et al.*, 2001; BASIR *et al.*, 2012; LAMB *et al.*, 2006).

Há uma variedade de doenças que podem ser estudadas através da utilização destes roedores, dentre as quais destaca-se a Malária. Para estabelecer o desenvolvimento do quadro característico da doença, utiliza-se uma espécie de protozoário do gênero *Plasmodium* infectante somente em murinos. Existem 5 espécies de parasitas capazes de infectar roedores, todas oriundas do continente africano e pertencentes ao subgênero *Vinckeia*. São eles, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium atheruri*, *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium vinckei*, contudo, somente as espécies *P. berghei* e *P. yoelii* induzem o quadro de MCE (DE SOUZA & RILEY 2002; WHEELER *et al.*, 2000).

Segundo a literatura, existem linhagens de roedores mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença, tais como, CBA/J, C57BL/6 e a linhagem Albino Suíço. A cepa de *Plasmodium berghei* ANKA é a mais utilizada para modelo experimental de MC por melhor reproduzir as características observadas na MC humana, sendo capaz de ativar o sequestro de células na microcirculação e gerar alterações neurológicas nos roedores (ataxia, convulsões e coma) (AMANI *et al.*, 1998; LOU *et al.*, 2001; BAGOT *et al.*, 2002).

Dentre as linhagens resistentes destaca-se o BALB/C e A/J, os quais, ao serem inoculados com a cepa PbA, acabam desenvolvendo um quadro de malária sistêmica e evoluem a óbito em decorrência de hiperparasitemia e

anemia grave (LOU *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2009b; NEILL & HUNT, 1992). Enquanto que as linhagens susceptíveis desencadeiam uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α . Estas citocinas são essenciais para o desenvolvimento do quadro de MC, pois, o aumento da expressão de um tipo específico de receptores deste mediador inflamatório (TNFR2) gera, conseqüentemente, um aumento na susceptibilidade do modelo murino a desenvolver esta conseqüência da doença (KREMSNER *et al.*, 1991; SENALDI *et al.*, 1999).

A migração dos leucócitos na microvasculatura cerebral induz o aumento da resposta inflamatória, promovendo o aumento da produção de IL-1, IL-6 e TNF- α , e por tanto, ocasionando o aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, promovendo assim, o aumentando da citoaderência de células parasitadas na microvasculatura cerebral e conseqüente formação de rosetas. Este fenômeno gera obstrução dos microvasos, criando um estado de hipóxia cerebral, culminando na quebra da BHE (LOU *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 2011).

A quebra da BHE expõe o parênquima cerebral, permitindo que substâncias cheguem até o endotélio, favorecendo o desenvolvimento de alterações comportamentais e locomotoras, frequentemente observadas no decorrer do quadro de malária cerebral (MIRANDA *et al.*, 2010).

Estudos sugerem que as alterações evidenciadas no decorrer desta enfermidade encontram-se associados ao aumento da produção de radicais livres (RL), dentre os quais as espécies reativas de oxigênio (ERO's) desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do quadro de MC. Por tanto, durante a infecção por *P. berghei*, a produção dos ERO's pode ocorrer por oxidação do grupo heme (presente nas hemácias), produzindo elétrons capazes de reagir com o oxigênio molecular, ou por ativação da resposta imune do hospedeiro (GUHA *et al.*, 2006; BECKER *et al.*, 2004).

Neste contexto, a utilização de antioxidantes (tais como o açaí, fruto da *Euterpe oleracea*) são de extrema importância, devido a sua capacidade de ligar-se as ERO's e inativá-las, promovendo um equilíbrio no estado redox e

modulando a resposta inflamatória desencadeada durante o quadro de MC, mantendo assim, a integridade da BHE e protegendo, conseqüentemente, o SNC.

1.5. *Euterpe oleracea* (Açaí)

A *Euterpe oleracea* é uma palmeira cespitosa que pertence à família *Aracaceae*, podendo alcançar em torno de 15 a 30 metros de altura e de 12 a 18 centímetros de diâmetro, conforme evidenciado na Figura 6. De crescimento lento, necessita de bastante umidade e baixa incidência luminosa, podendo produzir de 3 a 4 cachos contendo entre 3 a 6 kg de frutos. Esta palmeira é comumente observada em solos de igapó, frequentemente encontrada em solos de várzea, onde a pluviosidade anual é bem distribuída. Tal fato, explica a grande produção e consumo do fruto nas diferentes cidades que compõem a Amazônia Brasileira, principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e Amapá (CARVALHO *et al.*, 1998b; VILLACHICA, H., *et al.* 1998; SCHAUSS *et al.*, 2006a e 2006b; DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004).



Figura 6: Foto das palmeiras *Euterpe oleracea* no Sítio Santa Fé, contendo os cachos com o fruto açaí. Fonte: Acervo pessoal.

O mercado mundial comercializa uma ampla variedade de produtos confeccionados ou desenvolvidos a partir desta palmeira, no entanto, são os pequenos frutos que ganham destaque. De aproximadamente 2 centímetros de diâmetro, o fruto chama-se “açai”; podendo também ser reconhecido em outras regiões como juçara, açai-de-touceira, açai-do-Pará ou açai-verdadeiro. Estes frutos apresentam aspecto globoso, pesando em média 2 gramas, com coloração violeta escura característico quando maduros, e recobertos por uma fina camada de casca comestível rica em fibras (SCHRECKINGER *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2000).

A partir da maceração dos frutos obtém-se um suco de consistência viscosa (polpa de açai), o qual pode ser consumido individualmente ou utilizado na produção de geleias, sorvetes, licores e energéticos. O açai pode ser obtido durante o ano todo, tendo maior demanda nos meses entre Julho e Dezembro (período de alta estação), devido à maior qualidade organoléptica do fruto (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004, ROGEZ, 2000).

O alto valor nutricional do açai e suas diversas propriedades farmacológicas são fatores fundamentais para seu consumo. A polpa apresenta moléculas bioativas com diferentes propriedades, tais como, função imunomoduladora, cardioprotetora, anti-inflamatória, antiproliferativa e anticonvulsivante (MACHADO, *et al.*, 2016). Fonte de proteínas, minerais (cobre, zinco, cálcio, ferro, magnésio, fósforo e potássio) e de ácidos graxos essenciais, (ômega 6 e 9), a polpa de açai também possui alto teor de antocianinas (cianidina-3-glucosídeo (C3G) e cianidina-3-rutinosídeo (C3R)) e outros flavonoides (MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2006; DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2006; NERI-NUMA *et al.*, 2017).

Os efeitos benéficos do açai podem estar atribuídos a diversos compostos, porém sua atividade antioxidante vem sendo restrita aos flavonóides, dentre os quais destacam-se, a orientina, homoorientina, catecina, epicatecina, ácido ferrúlico, ácido vanílico, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico e ácido sirínico. Estes compostos fenólicos contribuem para manter o equilíbrio entre a produção e eliminação de ERO's, reduzindo, por tanto, os

danos causados nas células pelos radicais livres (CARVALHO *et al.*, 2006, GUERRA *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2015).

Diversos estudos já foram realizados utilizando o fruto da *Euterpe oleracea*, geralmente sendo realizado um tratamento por via oral com o intuito de avaliar alterações funcionais e/ou comportamentais no decorrer da patogênese de diversas doenças. Além de evidenciar que o efeito protetor da polpa de açaí sobre os neurônios está associado à sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória, como descrito na Tabela 1 (POULOSE, 2012; NERI-NUMA *et al.*, 2017).

Fonte	Efeitos Metabólicos		
	Modelo	Efeito	Referências
Suco de açaí concentrado	Efeito Anti-lipedêmico e Anti-inflamatório em células adiposas de camundongos.	↓Lipídios intracelulares ↑Expressão de adiponectinas	TALCOTT <i>et al.</i> , 2016.
Frações da polpa de fruta	Efeito protetor em células microgliais	↓ Produção de Nitritos, expressão de iNOS, TNF – α e NF-kB.	POLOUSE, 2012.
Polpa de açaí	Atividade Antioxidante Genotoxicidade	↑ Enzima Catalase ↓ danos causados ao DNA de células do fígado e rins.	SILVA & SOUZA <i>et al.</i> , 2016. RIBEIRO <i>et al.</i> , 2010.
Polpa de açaí congelada	Esteatose induzida pela NAFLD em camundongos	Efeito protetor contra NAFLD ↓ TAG no fígado	GUERRA <i>et al.</i> , 2015.
Polpa de açaí pasteurizada	Modula os genes expressos na homeostase do Colesterol	↓ LDL	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2012.
Extrato de açaí rico em Antocianinas	Células C-6 (ratos)	↓ Fragmentação do DNA.	HOGAN <i>et al.</i> , 2010.
Polissacarídeos isolados da polpa de açaí	Introduz a resposta imune innata	Recrutamento de IL-12	HOLDERNESS <i>et al.</i> , 2011.
Casca e sementes de açaí	Efeito citotóxico em linhagens de células oncogênicas	↓ Proliferação de células oncogênicas.	SILVA <i>et al.</i> , 2014. BARROS <i>et al.</i> , 2015.

Ração enriquecida com açaí	Retina de ratos	Previne o déficit eletrofisiológico e estresse oxidativo induzido por metilmercúrio.	BRASIL <i>et al.</i> , 2016.
Suco de açaí clarificado	Cultura de neurônios corticais e astrócitos	Efeito anticonvulsivante no sistema GABAérgico.	ARRIFANO <i>et al.</i> , 2018.
	Efeito neuroprotetor, anticonvulsivante e antidepressivo.	↑ Latências de crises convulsivas induzidas pelo Pentilenotetrazol.	MONTEIRO, 2016.
	Efeito neuroprotetor em exposição aguda ao Metilmercúrio (MeHg)	Proteção contra dano oxidativo.	SOARES, 2017.

Tabela 1: Efeitos metabólicos da família *Aracaceae*. Fonte: Adaptado de NERINUMA *et al.*, 2017.

A polpa de açaí consegue proteger contra danos hepáticos, além de atenuar a inflamação pulmonar induzida pela fumaça de cigarro em modelo experimental murino (GUERRA *et al.*, 2015; MOURA *et al.*, 2012). Segundo XIE *et al.* (2012) reportou que os flavonóides presentes no fruto possuem a capacidade de reduzir a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6), inibindo assim, a ativação do fator nuclear NF- κ B. Enquanto que BRASIL *et al.* (2016) descreve que uma dieta enriquecida com açaí pode prevenir o desenvolvimento de estresse oxidativo e consequente toxicidade do metilmercúrio (MeHg) no tecido retiniano.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor do Açaí (*Euterpe oleracea*) no quadro de malária cerebral, induzido por *Plasmodium berghei* (PbA) em modelo murino.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinação da curva de sobrevivência de camundongos da linhagem albino suíço inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA).
- Avaliar a porcentagem de parasitemia e alterações na massa corpórea em camundongos da linhagem albino suíço inoculados com a cepa PbA.
- Verificar o efeito do Açaí (*Euterpe oleracea*) no desenvolvimento do quadro de malária cerebral (MC) em camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA.
- Avaliar o extravasamento vascular no tecido cerebral de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA e tratados com Açaí no 7º dia pós-infecção (d.p.i.).
- Avaliar alterações locomotoras de camundongos albino suíço inoculados com PbA e tratados com Açaí nos dias 3, 5, 7, 9 e 12 pós infecção (d.p.i), utilizando como base o Protocolo SHIRPA e o Teste de Campo aberto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais Experimentais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Albino Suíço (machos e fêmeas), entre 46-54 dias pós-natal, pesando aproximadamente 20-25 gramas, obtidos no biotério central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em grupos de no máximo 5 camundongos por gaiola, em condições assépticas, com comida controlada e água (NUTIVAL) *ad libitum* e sob condições de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) controladas. As normas éticas para pesquisa com animais de laboratório foram respeitadas, estando este projeto aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animal (CEUA) parecer 6211241117.

3.2. Ração enriquecida com Polpa de Açaí (*Euterpe oleracea*)

A polpa de açaí fresca foi processada a partir da obtenção dos frutos brutos presentes nos cachos das palmeiras localizadas no Sítio Santa Fé (Bairro Areia Branca - Santa Izabel do Para – Pará), conforme mostrado nas Figuras 7 e 8. Esta polpa, com aproximadamente 90% de umidade, foi homogeneizada ao farelo da ração comercial padrão na proporção de 10% de peso seco do fruto, ou seja, a cada 1 litro de polpa de açaí (100g de peso seco) foi adicionado 900g de farelo de ração padrão. Os pellets obtidos foram aquecidos a 150°C durante 60 minutos com o intuito de reduzir a umidade dos mesmos, em seguida, foram pesados e armazenados dentro de sacos plásticos hermeticamente fechados e mantidos em refrigeração por períodos entre 3 a 5 dias. O protocolo utilizado para a fabricação da ração enriquecida com açaí foi adaptado de BRASIL *et al.*, 2016.



Figura 7: Foto dos cachos de açaí para obtenção da polpa. Fonte: Acervo pessoal.

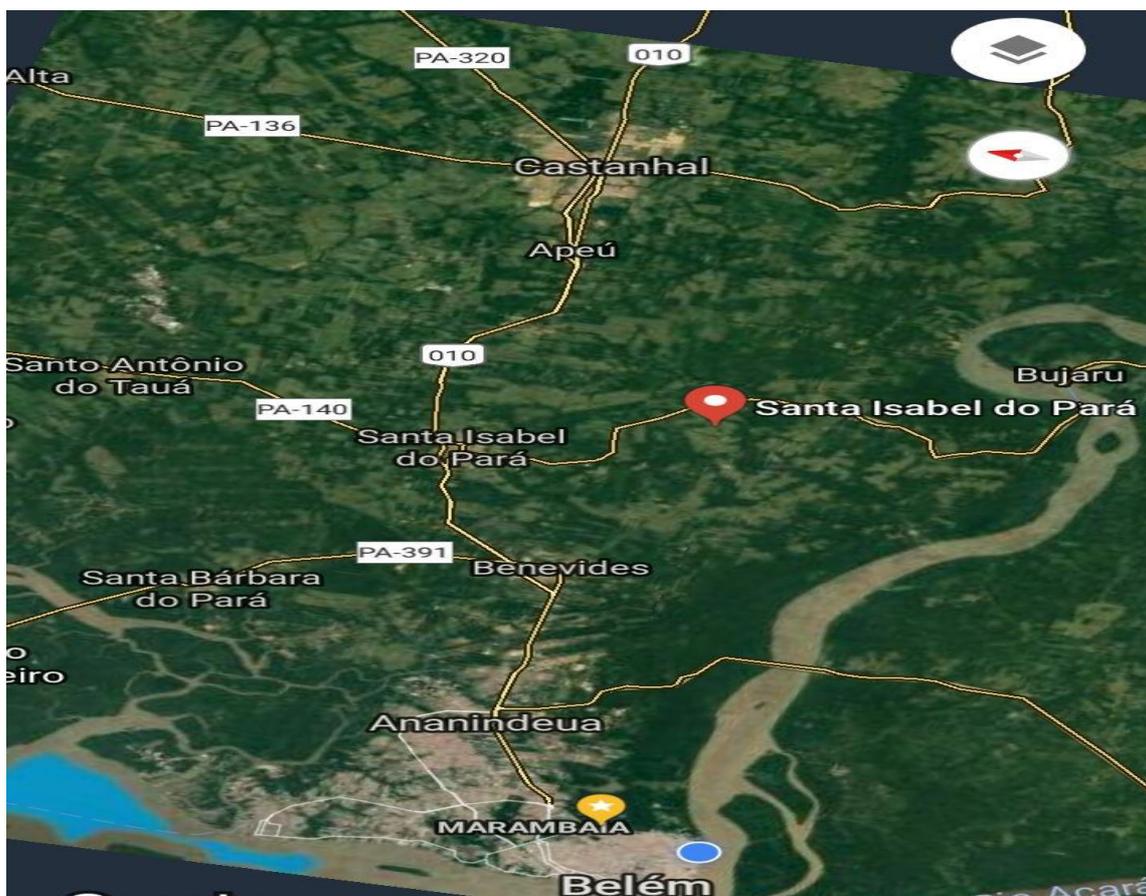


Figura 8: Mapa geográfico mostrando a localização do Sítio Santa Fé, de onde foram obtidos os frutos da *Euterpe oleracea*. Fonte: Google maps, 2018.

A ração enriquecida (Figura 9) foi ofertada aos animais diariamente por um período de dez dias antes da inoculação da cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA), como forma de pré-tratamento. Após isso foi inoculado a cepa ANKA nos animais e estes continuaram a receber a ração enriquecida como forma de tratamento até a evolução a óbito dos animais. Diariamente os pellets foram pesados e ofertados aos animais para obter controle do consumo alimentar.



Figura 9: Foto da ração enriquecida com açaí. Fonte: Acervo pessoal.

Foram colhidas amostras do caule da palmeira (*Euterpe oleracea*) da qual foram obtidos os cachos de açaí, com o intuito de posterior envio do material para a realização de exsiccatas, para afins de estudo botânico.

3.3. Indução do Quadro de Malária Experimental

Para indução do quadro de malária foi utilizada a cepa ANKA de *Plasmodium berghei*, obtida no Laboratório de Neurofarmacologia Experimental (UFPA). Inicialmente, uma alíquota de sangue foi descongelada e inoculada em um camundongo Albino Suíço por injeção intraperitoneal (i.p). Ao atingir entre 5-10% de parasitemia, o sangue foi coletado por punção cardíaca com o auxílio de uma seringa de insulina contendo PBS/EDTA (NaCl 137 mM; KCl

,2,7 mM; Na₂HPO₄ 0,8 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM; EDTA 10%; pH 7.4) e inoculado em um outro camundongo até atingir novamente uma parasitemia de 5-10%. Para garantir uma inoculação uniforme nos diferentes grupos, os animais foram inoculados via i.p com inóculo de 10⁶ eritrócitos parasitados diluído em 100µl de PBS. A quantificação dos eritrócitos parasitados foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer através do número total de eritrócitos em suspensão pela porcentagem de parasitemia.

3.4. Grupos Experimentais e Tratamento com Açai (*Euterpe oleracea*)

Para a realização dos experimentos, os camundongos foram divididos em quatro grupos: Grupo Controle (n= 7), Grupo Controle Açai (n=7), Grupo Infectado (n= 10) e Grupo Infectado tratado com a ração enriquecida com açai (n= 10) (Quadro 2). Os grupos que receberam os pellets enriquecidos com açai foram pré-tratados durante 10 dias, com ofertas diárias de 5mg/kg por animal, e após infecção, o tratamento continuou até a evolução do animal à óbito, conforme ilustrado na Figura 10.

Grupo	Tratamento
Grupos controle	Ração Padrão
	Ração Enriquecida com Açai
Animais infectados (PbA)*	Ração Padrão
	Ração Enriquecida com Açai

Quadro 2: Organização dos grupos experimentais de acordo com o tratamento. **Plasmodium berghei* ANKA (PbA).

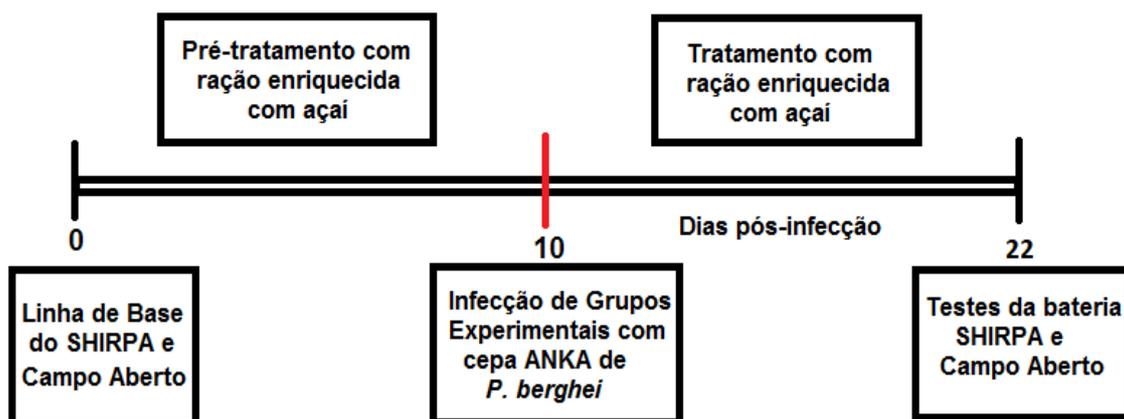


Figura 10: Desenho esquemático de linha temporal, evidenciando o período de pré-tratamento, inoculação da cepa PbA e tratamento dos camundongos da linhagem albino suíço infectados.

3.5. Caracterização de Malária Cerebral nos Grupos Experimentais

3.5.1. Massa Corpórea, Curva de Sobrevivência e Parasitemia

Para caracterizar o quadro de malária cerebral experimental (MCE), foram considerados vários parâmetros, entre eles, a variação de massa corpórea, a evolução da parasitemia e a sobrevivência do animal. Foi observado o surgimento dos sinais clínicos, entre o 5^o e 10^o dia após a inoculação (d.p.i.) da cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA), dentre os quais destacam-se: ataxia, paralisia, desorientação, convulsão e coma.

Foi realizado a curva de sobrevivência e a parasitemia dos grupos experimentais infectados, no qual a curva foi obtida considerando o número de animais que evoluíram a óbito e a porcentagem da parasitemia foi determinada a partir de distensões sanguíneas delgadas. As distensões foram realizadas em lamina histológicas e a gota de sangue foi extraída da veia da cauda de cada animal. Após secagem, as lâminas foram fixadas em Metanol absoluto (P.A) durante 2 minutos e logo coradas pelo método de Giemsa (10%) por 10 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram observadas em microscópio óptico (NIKON, modelo E200) com óleo de imersão (1000X maximização final). A porcentagem de parasitemia dos animais foi determinada a partir da razão

entre a quantidade de eritrócitos parasitados e a quantidade total de células, conforme observado na equação abaixo.

$$\% \text{ PARASITEMIA} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de eritrócitos parasitados} \times 100}{1000}$$

A contagem das células foi realizada com o auxílio do programa ImageJ, garantindo maior precisão na porcentagem de parasitemia de cada animal. A determinação da parasitemia foi realizada nos dias 3, 5, 7, 9 e 12 dias pós-infecção.

Para o monitoramento da Massa corpórea, os camundongos foram pesados diariamente antes da infecção, com o intuito de avaliar a massa corpórea. Após serem infectados com a cepa PbA, os animais continuaram a ser monitorados no decorrer do experimento, registrando-se o consumo alimentar a partir da pesagem das rações diárias (considerando a diferença entre a ração ofertada e as sobras do dia seguinte à oferta). O experimento durou aproximadamente 22 dias (dez dias de pré-tratamento e doze dias de tratamento), ou até o último animal evoluir à óbito.

3.6. Permeabilidade Vascular

O ensaio de permeabilidade vascular será realizado com o intuito de caracterizar a presença de extravasamento vascular no tecido cerebral de camundongos da linhagem albino suíço inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA), além de confirmar a presença do quadro de malária cerebral experimental (MCE) através da utilização do corante Azul de Evans como marcador, adaptado do método descrito por SCHMIDT *et al.*, 2011.

No 7º dia pós-infecção, após a realização de todos os experimentos comportamentais, os camundongos dos grupos controle e infectado serão anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução de Cloridrato de Quetamina (1 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (1 mg/kg), seguido da injeção de corante Azul de Evans a 2% (200 µl) no coração de cada animal. Após o

bombeamento do corante para o corpo do animal, este será perfundido com 10ml de Solução Salina (0,9%) e o cérebro será coletado por craniotomia. Posteriormente, o cérebro será colocado em uma placa de Petri e levado a uma lupa acoplada ao Sistema de Captura de Imagem (NIKON, modelo SMZ1500) para realização do registro fotográfico de possível presença de extravasamento vascular na microvasculatura do animal.

3.7. Ensaio de Comportamento (Protocolo SHIRPA)

Será realizado o teste comportamental e funcional utilizando como base o protocolo SHIRPA (cuja sigla significa “**S**mithKline Becham Pharmaceuticals; **H**arwell, MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit; **I**mperial College School of Medicine at St Mary’s; **R**oyal London Hospital, St Bartholomew’s and the Royal London School of Medicine; **P**henotype **A**ssessment”), cujos equipamentos utilizados para avaliação foram adaptados do protocolo de ROGERS *et al.*, 1997 e 2001. Esta bateria de testes é realizada com o intuito de avaliar alterações comportamentais e neurológicas no decorrer da infecção pela cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA) (MARTINS *et al.*, 2010).

Os parâmetros avaliados serão classificados em 5 categorias funcionais, as quais podem ser observadas no Quadro 3.

Domínios Funcionais	Parâmetros Avaliados
Comportamento Motor	Posição corporal, Elevação pélvica, Elevação da cauda, Marcha, Encurvamento do tronco, Tremor, Geotaxis negativa, Manobra do arame (“Wire manoeuvre”).
Tônus Muscular e Força	Força ao agarrar, Tônus abdominal, Tônus corporal, Tônus dos membros.
Reflexo e Função Sensorial	Posicionamento visual, Reflexo auricular (“Pinna reflex”), Reflexo corneal, Reflexo de endireitamento, Beslicada dos dedos da pata traseira (“Toe pinch”).
Aspectos Neuropsiquiátricos	Excitação de transferência, Passividade posicional, Atividade espontânea, Escape ao toque, Mordida, Medo, Irritabilidade, Agressão e Vocalização.
Função Autonômica	Taxa de respiração, Piloereção, Frequência cardíaca, Lacrimejamento, Salivação, Fechamento das pálpebras, Micção e Defecação.

Quadro 3: Classificação das categorias funcionais e parâmetros avaliados no protocolo SHIRPA. Fonte: Adaptado de LACKNER *et al.*, 2006.

Em cada categoria serão avaliados diversos parâmetros com scores independentes, caracterizando presença ou ausência do parâmetro; além de determinar níveis de avaliação para o mesmo, conforme especificado no Quadro 4 abaixo.

	Parâmetros	Descrição	Scores
1	Coloração dos Pelos	Observação da coloração dos pelos do animal.	Normal= 0 Alteração de coloração= 1
2	Morfologia dos Pelos	Observação da morfologia dos pelos do animal.	Normal= 0 Ondulado= 1 Outros= 2
3	Piloereção	Observação da posição dos pelos do animal.	Presente= 0 Ausente= 1
4	Coloração da Pele	Observação da coloração da pele da superfície plantar e os dígitos dos membros.	Pálido= 0 Rosado= 1 Vermelho= 2
5	Morfologia Auricular	Observação da morfologia auricular.	Normal= 0 Anormal= 1
6	Reflexo Auricular ("Pinna Reflex")	Observação da retração auricular do animal.	Ausente= 0 Retração Ativa= 1 Hiperatividade= 2
7	Reflexo Corneal	Observação do reflexo corneal do animal.	Ausente= 0 Ativo (1 olho)= 1 Ativo (2 olhos)= 2
8	Reflexo de Endireitamento	Observação da posição de pouso do animal.	Cai para a direita quando colocado de costas= 0 Cai de costas= 1 Cai de lado= 2 Sem comprometimento= 3
9	Reflexo de Endireitamento por contato	Observação da posição de pouso do animal após colocá-lo de cabeça para baixo.	Ausente= 0 Presente= 1

10	Posição do Corpo	Observação da posição do corpo do animal.	Totalmente plano= 0 Deitado de lado= 1 Deitado de bruços= 2 Sentado ou em Pé= 3 Apoiado nas patas traseiras= 4 Pulando= 5
11	Elevação Pélvica	Observação da posição da pélvis do animal.	Acentuadamente plana= 0 Apenas toca= 1 Normal (3mm)= 2 Elevada (\geq 3mm)= 3
12	Elevação da Cauda	Observação da posição da cauda do animal.	Puxando= 0 Estendida Horizontalmente= 1 Elevada= 2
13	Morfologia da Cauda	Observação da morfologia da cauda dos animais.	Normal= 0 Anormal= 1
14	Tônus Corporal	Observação do tônus corporal do animal.	Flácido= 0 Resistência Leve= 1 Resistência Extrema= 2
15	Tônus Abdominal	Observação do tônus abdominal do animal.	Flácido= 0 Resistência Leve= 1 Resistência Extrema= 2
16	Tônus dos Membros	Observação da resistência à pressão dos membros anteriores e posteriores do animal.	Ausente= 0 Resistência Leve= 1 Resistência Moderada= 2 Resistência Marcada= 3 Resistência Extrema= 4
17	Ondulação do Tronco	Observação da posição do corpo do animal.	Ausente= 0 Presente= 1

18	Atividade Espontânea	Observação da atividade realizada durante 5 minutos.	Nenhuma/Descansando= 0 Coçar casualmente/ Movimentos Lentos= 1 Coçar vigorosamente/ Movimentos Moderados= 2 Coçar vigorosamente/ Movimentos rápidos= 3 Coçar extremadamente= 4
19	Fechamento das Pálpebras	Observação da capacidade do animal de fechar os olhos.	Olhos Fechados= 0 Olhos Semi-abertos= 1 Olhos Abertos= 2
20	Taxa de Respiração	Observação da taxa respiratória do animal.	Ofegante/Irregular= 0 Lenta= 1 Normal= 2 Hiperventilação= 3
21	Tremor	Observação da presença de tremores no animal.	Importante= 0 Moderado= 1 Ausente= 2
22	Lacrimejamento	Observação da presença de lágrimas na região periorbital do animal.	Presente= 0 Ausente= 1
23	Salivação	Observação da presença de saliva na área submaxilar.	Zona totalmente úmida= 0 Zona levemente úmida= 1 Ausente= 2
24	Mordida	Observação da capacidade de mordida provocada com o auxílio de uma haste.	Presente= 0 Ausente= 1

25	Geotaxis Negativa	Observação do comportamento do animal após coloca-lo em uma grade e posicionar a mesma de cabeça para baixo durante 30 segundos.	Cai = 0 Não se move durante 30 segundos= 1 Se move, mas não consegue se virar = 2 Se vira, mas fica estático= 3 Vira-se e escala a grade= 4
26	Medo	Observação do comportamento do animal após transferência de ambiente.	Estático quando troca de ambiente= 0 Ausente= 1
27	Irritabilidade	Observação do comportamento do animal após manipulação.	Ausente= 0 Presente= 1
28	Agressão	Observação do comportamento do animal após manipulação.	Ausente= 0 Provoca mordida ou ataca= 1
29	Vocalização	Observação da presença de vocalização após manipulação do animal.	Ausente= 0 Presente= 1
30	Manobra do Arame (“Wire Manoeuvre”)	Observação do comportamento do animal após deixá-lo em suspensão (pelas patas anteriores) em um arame durante 3 minutos.	Cai imediatamente= 0 Incapaz de levantar os membros inferiores / Cai em segundos= 1 Incapaz de agarrar com os membros inferiores= 2 Dificuldade de agarrar os membros inferiores= 3

			Agarra com os membros inferiores= 4
31	Força dos Membros	Observação da força dos membros anteriores e posteriores durante 3 minutos.	Ausente= 0 Presente= 1
32	Força ao Agarrar	Observação da capacidade do animal de agarrar com os membros anteriores, aplicando pequenos puxões pela cauda, utilizando uma grade como auxílio.	Ausente= 0 Leve/Semi-eficaz= 1 Moderado/Eficaz= 2 Ativo/Eficaz= 3 Inusualmente eficaz= 4
33	Beliscada na pata traseira ("Toe Pinch")	Observação do comportamento do animal após pressionar o dígito central da pata traseira com o auxílio de uma pinça.	Ausente= 0 Retirada ligeira= 1 Retirada Moderada= 2 Retirada Rápida= 3 Retirada Brusca/ Repetitiva= 4
34	Marcha	Observação da capacidade de locomoção do animal.	Incapacidade= 0 Movimentos Limitados= 1 Fluido/Anormal= 2 Normal= 3
35	Atividade Locomotora	Observação do número de	

		quadrantes explorados durante 30 segundos.	
36	Transferência de Ambiente	Observação do comportamento do animal após transferência de ambiente.	Coma= 0 Freeze prolongado/ Movimentos leves= 1 Freeze temporário/ Movimentos Moderados= 2 Freeze breve/ Movimentos Ativos= 3 Freeze Momentâneo/ Movimentos Ativos= 4 Sem Freeze/ Movimentos imediatos= 5 Extremamente excitado= 6
37	Escape ao Toque	Observação da capacidade de resposta à manipulação.	Sem Resposta= 0 Suave= 1 Moderada= 2 Vigorosa= 3
38	Peso	Observação da massa corpórea dos animais.	
39	Passividade Posicional	Observação da resposta do animal à manipulação sequencial.	Sem Reação= 0 Luta quando segurado pelas patas traseiras= 1 Luta quando posicionado de bruços= 2 Luta quando segurado pelo pescoço= 3 Luta quando segurado pela cauda= 4

40	Posicionamento Visual (“Grooming”)	Observação do comportamento do animal durante permanência na jarra de observação (“Viewing jar”).	Nenhum= 0 Contato acima do nariz= 1 Contato acima das vibrissas= 2 Contato antes das vibrissas (18mm)= 3 Extensão vigorosa (25mm)= 4
----	---	---	--

Quadro 4: Classificação e descrição dos parâmetros avaliados utilizando o protocolo SHIRPA, estabelecendo os devidos scores. Fonte: Adaptado de Lackner *et al.*, 2006.

O protocolo SHIRPA foi utilizado para avaliar o desempenho individual de cada animal objetivando fornecer o perfil comportamental e locomotor. A bateria de testes foi realizada antes da infecção pela cepa ANKA de *Plasmodium berghei* para registrar a linha de base, e nos dias 3, 5, 7, 9 e 12 pós-infecção, a fim de se verificar se os animais apresentavam alguma alteração.

Para o desenvolvimento do protocolo foram utilizados alguns equipamentos e utensílios que auxiliarão na avaliação morfológica e comportamental dos animais. Primeiramente, os animais permaneceram na sala de experimentos durante 20 minutos para ambientação, logo, utilizou-se um cilindro transparente de 15cm de altura por 11cm de largura chamado de jarra de observação (“viewing jar”), no qual o animal foi analisado durante 5 minutos.

Posteriormente, o animal foi posicionado sob uma grade para avaliação da força, tanto da força ao agarrar (através de leves “puxões” realizados pela cauda) ou por meio da realização do teste de geotaxis negativa (“negative geotaxis”). A primeira análise foi realizada durante 3 segundos, já o teste de geotaxis negativa teve duração de 30 segundos. Além disso, nesta etapa foi realizada a avaliação morfológica do animal, analisando também a presença ou ausência de reflexos: corneal, auricular (“pinna reflex”) e o reflexo de retirada da pata traseira (“toe pinch”). Todos estes testes foram realizados com o auxílio de uma haste e uma pinça respectivamente.

Após avaliação morfológica e de reflexos, realizou-se a análise da força dos membros do animal, por meio de sua capacidade de ficar pendurado em um arame, somente pelas patas dianteiras, durante 3 minutos. Por último, transferiu-se o animal para uma arena ampla (campo aberto) com o intuito de avaliação de capacidade locomotora, cuja análise foi registrada durante 5 minutos.

3.7.1. Campo Aberto

O teste de Campo Aberto é frequentemente utilizado para avaliar a capacidade locomotora de roedores. Para a realização do mesmo utilizou-se uma arena circular de 83cm de diâmetro por 52cm de altura, confeccionado em madeira e revestido internamente com lona preta. Primeiramente realizou-se o teste da linha de base, utilizando os animais antes da infecção, com o intuito de avaliar a atividade locomotora dos mesmos e destacar os parâmetros comportamentais. Após inoculação com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA), o teste foi realizado no 3^o, 5^o, 7^o, 9^o e 12^o d.p.i., onde os animais foram posicionados individualmente no centro do aparato e monitorados durante 5 minutos com o auxílio do programa Debut Video Capture Software, versão 1.49. A gravação foi analisada por meio do software X-PlorRat, versão 2005, e o parâmetro avaliado foi: Deslocamento vertical, por meio da quantificação dos centímetros percorridos pelo animal durante toda a sessão.

3.7.2. Análise Estatística

Os resultados foram analisados por meio do ANOVA de duas vias (análise de variância) seguido de pós-teste Tukey-Kramer (para análise de três ou mais grupos). Para avaliar os parâmetros obtidos no protocolo SHIRPA utilizou-se o pós teste não paramétrico de Wilcoxon. Todos os testes foram realizados com o auxílio do programa estatístico BioEstat versão 5.3, considerando significativo $p < 0,05$. Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes e os gráficos foram construídos considerando a média de cada grupo.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização e Efeito do açaí no quadro de malária cerebral experimental (MCE)

4.1.1. Variação de Massa Corpórea

Antes de caracterizarmos o efeito do açaí na evolução do quadro clínico da malária cerebral experimental (MCE), foi avaliada uma série de parâmetros com o intuito de padronizar o desenvolvimento do quadro de malária cerebral nos grupos inoculados com a cepa PbA.

Inicialmente, foi avaliada uma possível variação de massa corpórea dos camundongos albino suíço pertencentes aos quatro grupos experimentais (Controle, PbA, PbA + Açaí e Açaí) no decorrer da infecção. A massa corpórea dos animais foi mensurada nos dias 3, 5, 7, 9 e 12 pós-infecção. Pode-se observar que os animais do Grupo PbA, infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA) apresentaram alterações relacionadas ao ganho de massa corpórea, no decorrer da evolução da doença, conforme evidenciado na Figura 11. Entre o dia 3º e o 9º d.p.i observou-se que não houve diferença estatística significativa da massa corpórea entre os grupos infectados (PbA= 20.032±0.93 VS PbA + Açaí= 23.298±1.75; F[3,12]= 8.8947; p>0.05)

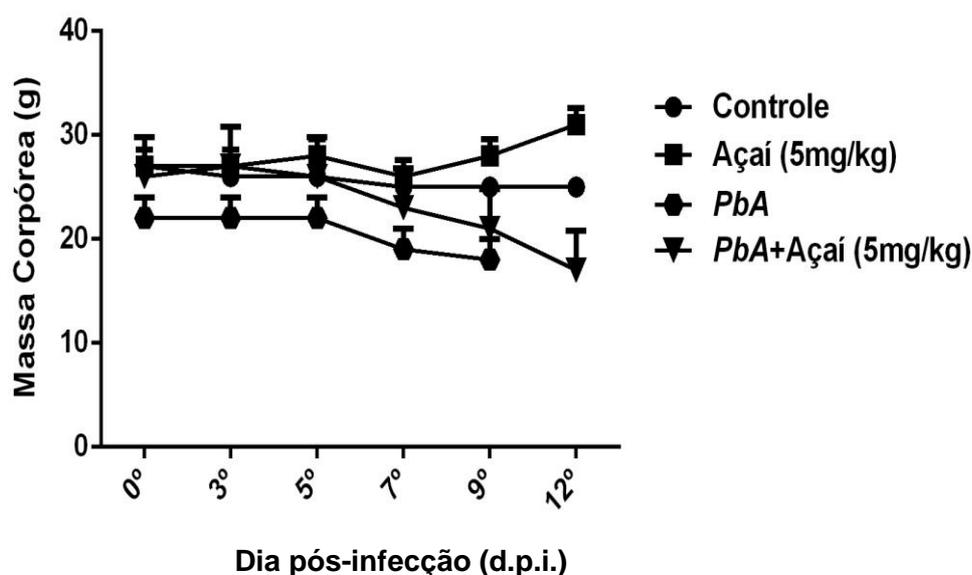


Figura 11: Avaliação de massa corpórea em camundongos albino suíços/ controles e infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA).

Grupos experimentais: Controle, PbA, PbA + Açai e Açai (n= 34 animais).
Dados apresentados em Média±Erro Padrão; $p < 0.05$.

4.1.2. Curva de sobrevivência e Sinais Clínicos

Foi avaliado o curso de desenvolvimento do quadro de malária cerebral experimental (MCE) em camundongos albinos suíço infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA), a partir do surgimento dos sinais clínicos característicos, evidenciados principalmente entre o 7º e 10º dia após a inoculação (d.p.i.), dentre os quais observou-se a ataxia, paralisia, desorientação, desvio da cabeça, convulsão e coma. Associada á esta análise, realizou-se a curva de sobrevivência dos animais por meio do monitoramento diário da taxa de sobrevivência dos mesmos. A curva foi obtida a partir da determinação do número de animais que evoluíram a óbito no seu respectivo dia após a infecção (d.p.i.).

Durante este período, foi possível observar que os camundongos inoculados com a cepa PbA desenvolveram uma infecção aguda e letal, com início no 7º dia pós-infecção (d.p.i) e mantendo-se até o 11º d.p.i, evidenciando uma diminuição significativa na taxa de sobrevivência destes. Contudo, observou-se que os animais infectados e tratados com ração enriquecida com açai (grupo PbA + Açai) obtiveram um aumento na taxa de sobrevivência, evoluindo a óbito a partir do 13º d.p.i. , como demonstrado na Figura 12.

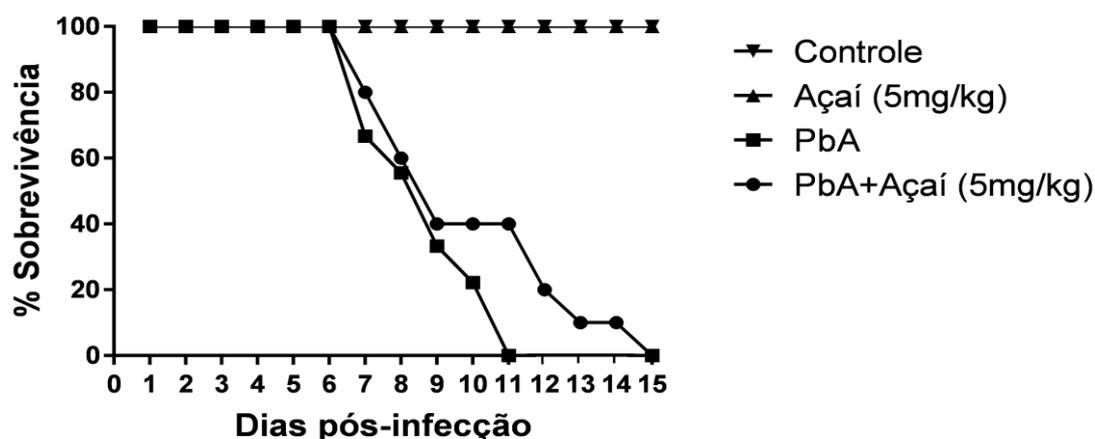


Figura 12: Curva de sobrevivência de camundongos albino suíço infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Os animais foram inoculados

com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando dois grupos experimentais: PbA e PbA + Açai (n= 20 animais).

4.1.3. Parasitemia

A evolução da parasitemia foi acompanhada a partir da obtenção de distensões sanguíneas delgadas realizadas nos dias 3, 5, 7, 9 e 12 pós inoculação com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Durante a análise observou-se uma rápida progressão da parasitemia nos animais que desenvolveram o quadro de malária cerebral experimental (MCE).

No 3º dia foi observada uma parasitemia inicial de 3-5%, a qual aumenta gradativamente, registrando a partir do 5º d.p.i. um percentual de 13-14%, onde pode-se observar que houve um aumento do nível de parasitemia dos animais que desenvolveram o quadro clínico de MCE. A partir do 7º d.p.i, registrou-se no grupo PbA + Açai uma parasitemia de 18,44%, enquanto que os animais do grupo PbA registraram 20,21%. O acompanhamento do desenvolvimento da parasitemia demonstrou que os animais do grupo PbA apresentavam uma parasitemia de aproximadamente (13,20%) quando evoluíram à óbito, enquanto os animais do grupo PbA + Açai registraram 16,29%, conforme mostrado na Figura 13.

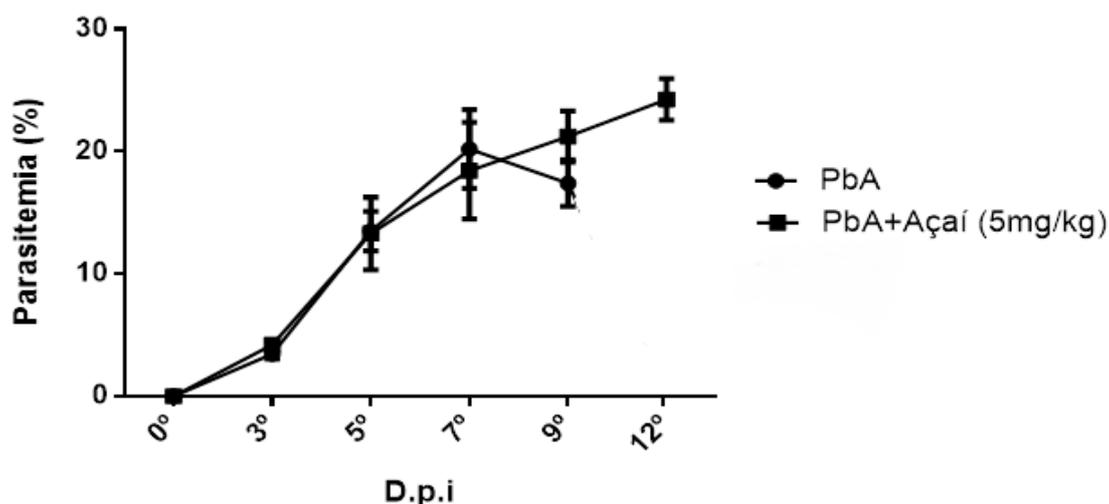


Figura 13: Parasitemia de camundongos albino suíço infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando os grupos experimentais PbA e PbA + Açai.

4.1.4. Permeabilidade Vascular

Os animais dos grupos controle (Controle e Açai) e infectados (PbA e PbA + Açai) foram submetidos ao Ensaio de Permeabilidade Vascular no 7^o d.p.i, o qual nos permitiu observar a presença ou ausência de extravasamento da microvasculatura cerebral. Entre os animais infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA), os pertencentes ao grupo PbA apresentaram a maioria dos sinais clínicos da doença, juntamente com presença de maior concentração do corante Azul de Evans, comprovando a ocorrência de extravasamento vascular. A partir deste dado, pode-se observar maior taxa de incidência do quadro de MCE nos animais do grupo PbA, que apresentaram uma concentração de aproximadamente 26µg/g de corante Azul de Evans, quando comparados com os animais do grupo PbA + Açai (12µg/g). Aproximadamente 85% do grupo tratado (PbA + Açai) não desenvolveu o quadro de extravasamento vascular, apresentando-se morfologicamente semelhante ao grupo controle, conforme evidenciado na Figura 14.

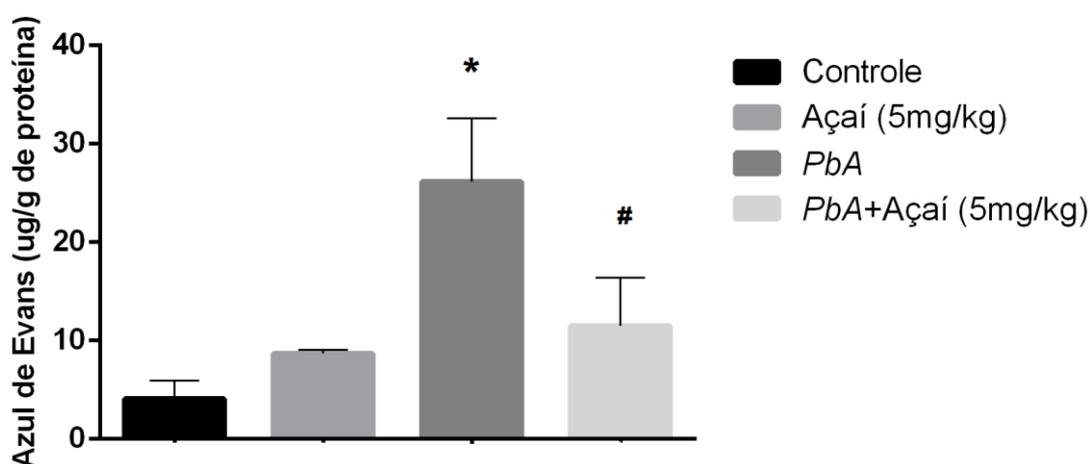


Figura 14: Permeabilidade vascular. Apresentando diferença significativa entre os grupos PbA e Controle, PbA e PbA + Açai (n=8). Dados expressos em média±EPM. *p<0.01 vs Controle, #p<0.01 vs PbA.

4.1.5. Ensaio de Comportamento (Protocolo SHIRPA)

Os animais dos grupos controle (Controle e Açai) e infectados (PbA e PbA + Açai), foram submetidos a avaliação de diversos testes paramétricos

com o intuito de verificar as alterações comportamentais geradas em decorrência do quadro de malária cerebral experimental (MCE) induzido pela infecção por cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA).

Foi possível observar o comprometimento de todos os domínios funcionais avaliados na realização do protocolo SHIRPA, demonstrando que houve diminuição do comportamento motor, dos reflexos dos animais e perda de força e tônus muscular, conforme observado nas Figura 15.

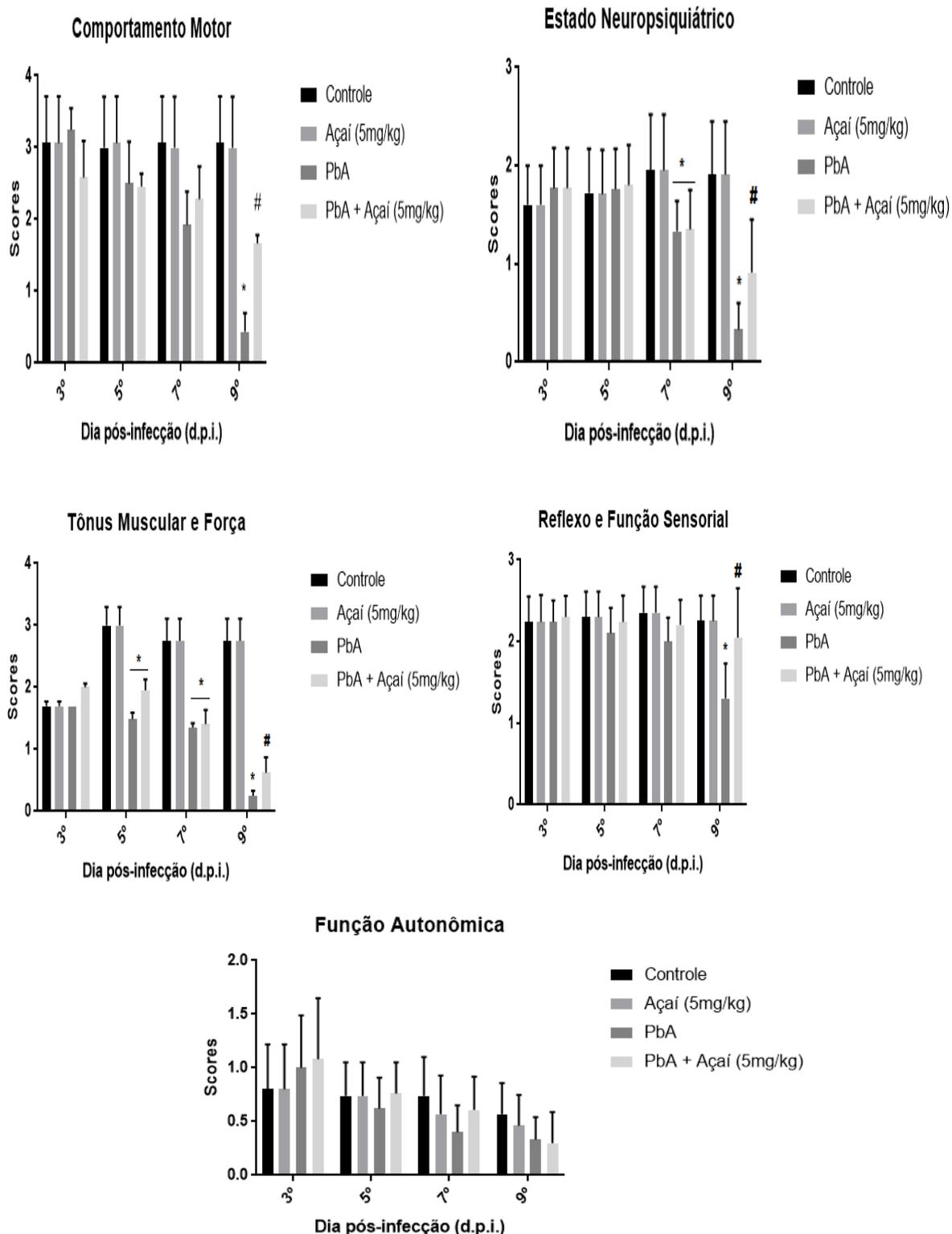


Figura 15: Comprometimento comportamental após inoculação da cepa PbA para indução do quadro de Malária Cerebral Experimental (MCE). O comprometimento foi avaliado em cinco diferentes categorias funcionais: comportamento motor, tônus muscular e força, reflexo e função sensorial,

estado neuropsiquiátrico e função autonômica utilizando a tabela primária do protocolo SHIRPA. A soma dos escores de todas as categorias foi registrada como uma pontuação total para cada grupo (n=10) e os dados estão expressos como média \pm SEM. ANOVA de uma via com pós teste não paramétrico de Wilcoxon. * $p < 0.0001$ PbA vs Controle. # $p < 0.0001$ PbA vs PbA + Açai.

4.1.6. Campo Aberto

Além da utilização do protocolo SHIRPA para avaliação da atividade locomotora do animal, também foi utilizado o teste de Campo Aberto com maior tempo de análise (5 minutos), com o intuito de obter um resultando adicional. Foi observado uma diminuição significativa da atividade locomota dos animais dos grupos infectados (PbA e PbA + Açai), quando comparados aos grupos Controle, sendo melhor evidenciado entre o 7º e o 12º d.p.i. na Figura 16.

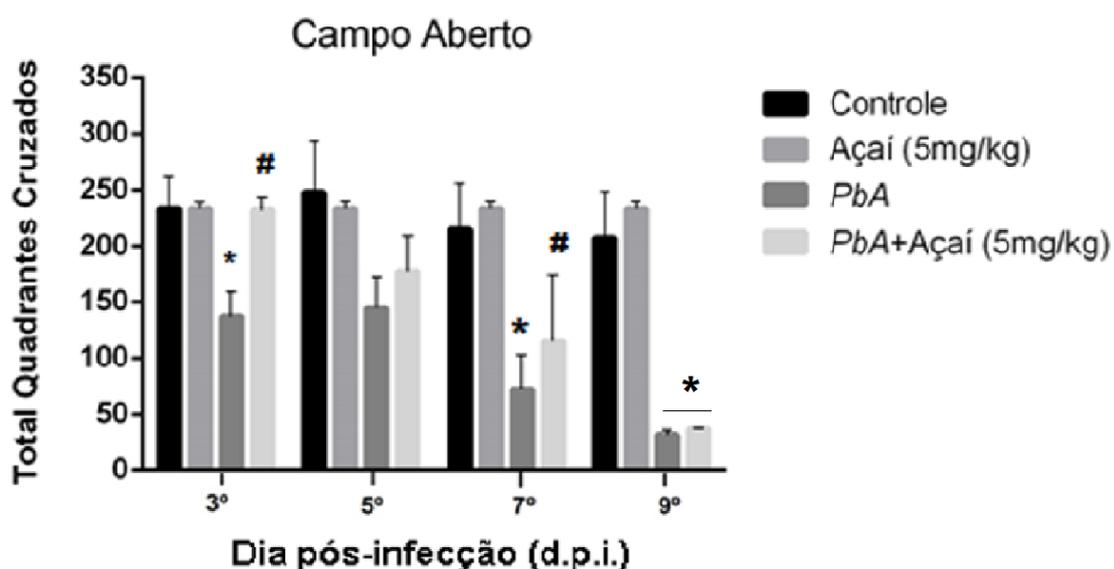


Figura 16: Atividade locomotora dos animais dos grupos Controle, Açai, PbA e PbA + Açai, a partir do número total de quadrantes cruzados no 3º, 5º, 7º e 9º dia pós-infecção (d.p.i.). * $p < 0.05$ PbA vs Controle, # $p < 0.05$ PbA vs PbA + Açai.

5. DISCUSSÃO

A malária cerebral (MC) é uma doença infecciosa de patogênese complexa, cujos mecanismos de ação ainda encontram-se pouco elucidados. A literatura descreve que o desenvolvimento deste quadro está associado à citoaderência de eritrócitos parasitados no endotélio vascular e a uma resposta imunológica exacerbada, desencadeando na quebra da barreira hematoencefálica (BHE) e consequente desenvolvimento dos sinais e sintomas observados no decorrer do quadro (COMBES *et al.*, 2006; MILLER *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2014).

Neste trabalho, utilizou-se modelo murino para avaliar a malária cerebral experimental (MCE), onde camundongos da linhagem albino suíço foram inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Dentre os modelos murinos, esta linhagem é uma das mais susceptíveis a infecção por PbA, além de gerar o quadro de MCE, estes animais conseguem desenvolver sinais clínicos semelhantes aos observados em infecções por *Plasmodium falciparum* em humanos, tais como: ataxia, convulsões e coma (MARTINS *et al.*, 2009a; HANUM *et al.*, 2003).

Segundo BAGOT *et al.*, 2002, a incidência do desenvolvimento do quadro de MCE em camundongos infectados com a cepa PbA pode variar entre 60-100%, dependendo do peso, idade e perfil genético dos animais, além da quantidade de eritrócitos parasitados que são inoculados.

Para caracterizar o desenvolvimento do quadro de MCE, foi considerada a taxa de sobrevivência e a porcentagem de parasitemia. Como descrito em nossos resultados, 100% dos camundongos inoculados com a cepa PbA (inóculo de 10^6) e pertencentes ao grupo PbA desenvolveram MCE, evoluindo a óbito entre o 7^o e 11^o d.p.i., o que se assemelha ao descrito na literatura, onde evidencia-se que os camundongos susceptíveis a desenvolver o quadro de MCE evoluem a óbito entre o 6^o-10^o d.p.i. com uma baixa porcentagem de parasitemia (MARTINS *et al.*, 2009b; QUEIROZ *et al.*, 2010).

Também foi observado que os animais infectados (grupos PbA e PbA + Açai) apresentaram uma rápida progressão da parasitemia, melhor evidenciada

entre o 5^o e 12^o d.p.i., além de evidenciar que o açaí não agiu como antimalárico e não alterou a porcentagem de parasitemia entre os grupos infectados. Fatos semelhantes foram descritos na literatura, como o relatado por MILLER *et al.*, (2002), o qual afirma que a porcentagem de parasitemia encontra-se associado tanto à uma resposta imunológica exacerbada quanto à citoaderência dos eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral.

Além dos sinais clínicos, taxa de sobrevivência e porcentagem de parasitemia, este trabalho também avaliou uma possível variação de massa corpórea dos animais pertencentes aos quatro grupos experimentais (Controle, Açaí, PbA e PbA + Açaí). Contudo, verificamos que não houve variação de massa corpórea no decorrer da infecção, demonstrando que o fornecimento de ração padrão (grupos Controle e PbA) e de ração enriquecida com açaí (grupos Açaí e PbA + Açaí) não influenciou na massa corpórea dos animais. DAÍ *et al.*, (2012) corrobora estes dados, uma vez que afirma que o quadro de MCE não é capaz de alterar a massa corpórea em modelo murino até o 7^o d.p.i, podendo, no entanto, apresentar diminuição de massa corpórea apenas no 9^o d.p.i.

Avaliamos também o extravasamento da microvasculatura cerebral em camundongos albino suíço por meio do ensaio de permeabilidade vascular pelo uso do corante Azul de Evans. Conseguimos identificar que os animais do grupo PbA apresentava maior número de vasos extravasados quando comparados aos animais do grupo PbA + Açaí, além de evidenciar que os animais dos grupos Controle e Açaí apresentavam integridade da barreira hematoencefálica. Este fato foi confirmado pela maior concentração de corante Azul de Evans na microvasculatura cerebral extravasada nos animais do grupo PbA. Conforme descrito no trabalho de SCHMIDT *et al.*, (2011), é evidente observar a presença de extravasamento vascular em camundongos com o quadro de MCE, assim como a total integridade dos vasos sanguíneos que irrigam o tecido cerebral em camundongos controle.

Dados da literatura já elucidaram a presença de alterações comportamentais em modelo murino durante o desenvolvimento da doença, sendo principalmente desencadeados em virtude da quebra da barreira

hematoencefálica. De acordo com ADAMS *et al.* (2002), o aumento da permeabilidade da BHE ocorre no início da infecção por cepa PbA, promovendo danos ao endotélio no decorrer da doença.

Nossos resultados evidenciaram alterações comportamentais nos animais infectados com a cepa PbA, a partir da análise por observação com auxílio do protocolo SHIRPA para avaliação de diversos parâmetros. A bateria de testes realizada no SHIRPA é considerada uma ferramenta de extrema importância para avaliação da função neurológica de diversas doenças em modelo murino. Segundo LACKNER *et al.*, (2016), vários scores obtidos no protocolo estão associados ao desenvolvimento do quadro de malária cerebral (MC).

Conseguimos observar uma diminuição na atividade exploratória dos animais do grupo PbA, quando comparados ao grupo PbA + Açaí, sendo melhor evidenciada entre o 5º e 9º d.p.i. Os animais tratados com a ração enriquecida com açaí não apresentaram diminuição significativa deste parâmetro, mostrando o seu efeito protetor no endotélio cerebral. Este fato já foi descrito por ZHANG *et al.* (2016), sugerindo que o aumento da atividade exploratória dos animais, assim como o aumento da frequência das necessidades fisiológicas (micção e defecação) encontra-se diretamente associado à sensibilidade (estado de ansiedade) dos animais quando colocados em ambientes nunca antes explorados. Além disso, os autores também sugerem que os animais que apresentavam maior elevação pélvica apresentavam melhor flexibilidade e tônus muscular.

Os resultados obtidos comprovam o fato evidenciado por ZHANG *et al.*, (2016) haja vista que os animais infectados de ambos grupos (PbA e PbA +Açaí) também apresentaram diminuição da flexibilidade e do tônus muscular, tanto dos membros quanto tônus abdominal. Ademais, os testes nos permitiram evidenciar que os animais dos grupos Controle e Açaí apresentaram maior flexibilidade, tônus muscular e força quando comparados aos animais infectados, comprovando novamente que a infecção pela cepa PbA promove o desenvolvimento de alterações comportamentais e funcionais, comumente

evidenciadas no decorrer do quadro de MCE (MASUYA *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2010).

Segundo MASUYA *et al.*, (2005), a elevação da cauda dos animais (>45°) é comumente observado em comportamentos mais agressivos, geralmente durante uma luta. Neste trabalho, a observação deste parâmetro nos permitiu sugerir que os animais apresentaram comportamento agressivo, o qual foi melhor evidenciado também, quando foram avaliados a capacidade de mordida e o teste do arame (“Wire Manoeuvre”).

Por outro lado, ao avaliar a atividade locomotora, observamos que os animais infectados, pertencentes ao grupo PbA + Açaí, apresentaram maior número de quadrantes cruzados explorados entre o 3º e o 9º d.p.i., quando comparados ao grupo PbA, o que sugere um aumento da capacidade locomotora e maior atividade exploratória quando posicionados em novos ambientes, o que novamente corrobora com o descrito no trabalho de ZHANG *et al.*, 2016.

Nossas análises permitiram evidenciar a alteração na performance dos animais durante o curso da infecção, melhor observadas entre o 5º e 9º d.p.i., mostrando que os animais apresentavam comprometimento neurológico. Este fato é semelhante ao relatado por CARVALHO *et al.*, (2013), o qual demonstrou que 100% dos animais infectados pela cepa PbA analisados apresentavam alguma alteração histológica no cérebro entre o 6º e 8º d.p.i.

Neste contexto, o trabalho de LACKNER *et al.* (2016), sugere que as alterações patofisiológicas em roedores são evidenciadas aproximadamente 36 horas antes do animal evoluir a óbito. Tal fato permite propor a utilização do protocolo SHIRPA para avaliação neurológica e comportamental dos camundongos infectados com a cepa PbA, com o intuito de prever o desenvolvimento do quadro de malária cerebral experimental (MCE) e retardar ou evitar o desenvolvimento da doença.

O fruto da *Euterpe oleracea* (Açaí), já vem sendo utilizado como terapia adjuvante no tratamento de diversas doenças, tanto pela sua capacidade anti-inflamatória, cardioprotetora e anti-convulsivante, quanto pela sua capacidade

antioxidante. A literatura comprova a alta capacidade antioxidante do açaí contra os radicais livres (RL), porém, sendo específica da polpa do fruto maduro (devido a presença de antocianinas) (LICHTENTHALER *et al.*, 2005).

Ainda não está totalmente claro se o açaí possui a capacidade de atravessar a BHE, porém, estudos descrevem seu efeito neuroprotetor. Nos estudos desenvolvidos por POULOSE *et al.*, (2012), o açaí foi capaz de atenuar a desregulação do íon cálcio presente nas células endoteliais do cérebro de roedores, além de modular a autofagia celular.

O trabalho de DIAS-SOUZA *et al.*, (2017) utiliza o extrato da *Euterpe oleracea* (polpa de açaí) contra infecções por *Staphylococcus aureus*, em associação com drogas antimicrobianas. Enquanto que MACHADO *et al.*, (2016), evidencia o efeito neuroprotetor do açaí (*Euterpe oleracea*) contra a exposição *in vitro* a rotenona (uma substância química utilizada como inseticida).

Assim, a literatura confirma que a polpa de açaí contém uma variedade de compostos bioativos que possuem a capacidade de atravessar a BHE, principalmente os flavonoides. Neste contexto, pode-se considerar que, talvez, estas moléculas são capazes de chegar ao cérebro e promover uma proteção extra ao parênquima cerebral, evitando assim o comprometimento da barreira e conseqüentemente retardando a evolução do quadro de malária cerebral (MC) durante a infecção pela cepa PbA.

6. CONCLUSÃO

- A infecção por cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA) apresenta um curso agudo e letal na linhagem de camundongo albino suíço, com manifestações clínicas mais evidentes entre o 6º e 9º dia após a infecção, momento em que a parasitemia permanecia em níveis baixos, em torno de 15 a 20%.
- Elucidamos a presença de extravasamento da microvasculatura no córtex de camundongos albinos suíços que desenvolveram o quadro de MCE e ausência de extravasamento nos animais que não desenvolveram o quadro.
- Durante o decorrer da infecção observou-se uma alteração comportamental e locomotora dos animais infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Por tanto, torna-se essencial a utilização do protocolo SHIRPA com o intuito de prever o desenvolvimento da doença em modelo murino de MCE.
- Evidenciamos o efeito protetor do açaí (*Euterpe oleracea*) no tecido cerebral de camundongos albino suíço infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA), através da diminuição de extravasamento da microvasculatura cerebral em camundongos infectados e tratados com ração enriquecida com Açaí (5mg/kg) antes e após inoculação da cepa. Esta proteção também foi evidenciada devido ao aumento da sobrevivência dos animais.

7. REFERÊNCIAS

ACTA PEDIÁTRICA PORTUGUESA. Malária – Protocolo Diagnóstico e Terapêutico. Secção de Infectologia Pediátrica da Sociedade Portuguesa de Pediatria, **Sociedade Portuguesa de Pediatria**, 37(5): 205-209, 2006.

ADAMS, S.; BROWN, H.; TURNER, G. Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? **Trends in Parasitology**, 18(8): 360-6, 2002.

AMANI, V.; BOUBOU, M.I.; PIED, S.; MARUSSIG, M.; WALLIKER, D.; MAZIER, D.; RÉNIA, L. Cloned lines of *Plasmodium berghei* ANKA differ in their abilities to induce experimental cerebral malaria. **Infection and Immunity**, 66(9): 4093-9, 1998.

ARMAH, H.; DODOO, A.K.; WIREDU, E.K.; STILES, J.K; ADJEI, A.A.; GYASI, R.K.; TETTEY Y. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 99(7): 629-47, 2005.

BAGOT, S.; IDRISSE-BOUBOU, M.; CAMPINO, S.; BEHRSCHEMIDT, C.; GORGETTE, O.; GUÉNET, J.L.; PENHA-GONÇALVES, C.; MAZIER, D.; PIED, S.; CAZENAVE, P.A. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. **Infection and Immunity**, 70(4): 2049-56, 2002.

BAKER, D.A. Malaria gametocytogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 172: 57-65, 2010.

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

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

BOYSEN, K.E. & MATUSCHEWSKI, E. Inhibitor of Cysteine Proteases Is Critical for Motility and Infectivity of *Plasmodium* Sporozoites. **mBio**, 4(6): e00874-13, 2013.

CARVALHO A. V., SILVEIRA T. F. F., MATTIETTO R. A., OLIVEIRA M. S. P., GODOY H. T. Chemical composition and antioxidante capacity of açaí (*Euterpe oleracea*) genotypes and comercial pulps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2006.

CARVALHO, J.E.U. *et al.* Características físicas e de germinação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia. Boletim de Pesquisa 203: 1-18p. Belém: **Embrapa-CPATU**, 1998b.

CLARK, I.A. & ROCKETT. The cytokine theory of human cerebral malaria. **Parasitology Today**, 10:410-412, 1994.

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

DEL POZO-INSFRAN D., BRENES C. H., TALCOTT S. T. Phytochemical composition and pigment stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52: 1539-1545, 2004.

DEL POZO-INSFRAN, D., PERCIVAL, S. S., TALCOTT, S. T. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 1222-1229, 2006.

DUNST, J., KAMENA, F., MATUSCHEWSKI, K. Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 7: 324, 2017.

EKSI, S.; CZESNY, B.; VAN GEMERT, G.J.; SAUERWEIN, R.W.; ELING, W.; WILLIAMSOM, K.C. Malaria transmission-blocking antigen, Psf 230, mediates human red blood cells binding to exflagellating male parasites and oocyst production. **Molecular Microbiology**, 61: 991-8, 2006.

FIEDLER., U.; REISS, Y.; SCHARPFENECKER, M.; GRUNOW, V.; KOIDI, S.; THURSTON, G.; GALE, N.W.; WITZENRATH, M.; ROSSEAU, S.; SUTTORP, N.; SOBKE, A.; HERMANN, M.; PREISSNER, K.T.; VAJKOCZY, P.; AUGUSTIN, H.G. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. **Nature Medicine**, 12(2): 235-9, 2006.

FREITAS, B., BENTO F. S., SANTOS, F. Q., FIGUEIREDO M., AMÉRICA P., MARÇAL, P. Características físico-químicas, bromatológicas, microbiológicas e microscópicas de polpas de açaí (*Euterpe oleracea*) congeladas do tipo B. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences – JAPHAC**, 2(2): 2-13, 2015.

GOMES A. P., VITORINO R. R., COSTA A. P., MENDONÇA E. G., OLIVEIRA M. G. A., SIQUEIRA-BATISTA R. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 23(3): 358-369, 2011.

GUERRA, J. F. C., MAGALHÃES, C. L. B., COSTA D. C., SILVA, M. E., PEDROSA M. L. Dietary açaí modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidante enzymes in rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 49: 188-194, 2011.

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

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**, 2: 217-49, 2007.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açaí. **Food Chemistry**, 118, 208-214, 2010.

HORA, R., KAPOOR, P., THIND, K. K., MISHRA, P. C. Cerebral malaria – clinical manifestations and pathogenesis. **Metabolic Brain Disease**, 31(2):225-37, 2016.

IDRO, R.; JENKINS, N.E.; NEWTON, C.R. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. **Lancet Neurology**, 4(12): 827-40, 2005.

KREMSNER, P.G.; GRUNDMANN, H.; NEIFER, S.; SILWA, K.; SAHLMÜLLER, G.; HEGENSCHIED, B.; BIENZLE, U. Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. **Journal of infectious diseases**, 164: 605-8, 1991.

LACKNER P., BEER R., HEUSSLERT V., GOEBEL G., RUDZKI D., HELBOK R., TANNICH E., SCHMUTZHARD E. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, 32: 177-188, 2006.

LAMB, T.J.; BROWN, D.E.; POTOČNIK, A.J.; LANGHORNE, J. Insights into the LICHENTHALER R., RODRIGUES R. B., MAIA J. G. S., PAPAGIANNOPOULOS M., FABRICIUS H., MARX F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* (Açaí) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 56(1): 53-64, 2005.

LOU, J.; GASCHE, Y.; ZHENG, L.; CRITICO, B.; MONSO-HINARD, C.; JUILLARD, P.; MOREL, P.; BUURMAN, W.A.; GRAU, G.E. Differential reactivity of brain microvascular endothelial cells to TNF reflects the genetic susceptibility to cerebral malaria. **European Journal of Immunology**, 28(12): 3989-4000, 1998.

LOU, J.; LUCAS, R.; GRAU, G.E. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(4): 810-820, 2001.

MACHADO A. K., ANDREAZZA A. C., SILVA T. M., BOLIGON A. A., NASCIMENTO V., SCOLA G., DUONG A., CADONÁ F. C., RIBEIRO E. E., CRUZ I. B. M. Neuroprotective effects of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone *In Vitro* exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

MARTINS Y. C. WERNECK G. L., CARVALHO L. J., SILVA B. P. T., ANDRADE B. G., SOUZA T. M., SOUZA D. O., DANIEL-RIBEIRO C. T.

Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. **Malaria Journal**, 9:85, 2010.

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**, 16: 134-145, 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**, 16: 134-145, 2009a.

MARTINS, Y.C.; SMITH, M.J.; PELAJO-MACHADO, M.; WERNECK, G.L.; LENZI, H.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; CARVALHO, L.J.M.C. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. **International Journal of Experimental Pathology**, 90(2): 119–130, 2009b.

MATSUSHITA, S.; KIMURA, M.; MIYAKAWA, T.; YOSHINO, A.; MURAYAMA, M.; MASAKI, T.; HIGUCHI, S. Association study of Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphism and alcoholism. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 28(11), 2004.

MEDANA, I.M.; CHAUDHRI, G., CHAN-LING, T., HUNT, N.H. Central nervous system in cerebral malaria: “innocent bystander” or active participant in the induction of immunopathology. **Immunology and Cell Biology**, 79: 101- 120, 2001.

MERTENS-TALCOTT, S. U., RIOS, J., JILMA-STOHLAWETZ, P., PACHECO-PALENCIA, L. A., MEIBOHM, B., TALCOTT, S. T., DERENFORF, H. Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açaí Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56(10): 7796-7802, 2008.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**, 2018.

MIRANDA A. S., QUEIROZ N. L., RACHID M. A., TEIXEIRA A. L. Acute and residual neurological symptoms in malaria. **Revista Brasileira de Neurologia**, 46(3): 35-41, 2010a.

MIRANDA A. S., VIEIRA L. B., LACERDA-QUEIROZ N., SOUZA A. H., RODRIGUES D. H., VILELA M. C., GOMEZ M. V., MACHADO F. S., RACHID M. A., TEIXEIRA A. L. Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 43: 1173-1177, 2010b.

MOTA, M.M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J.P.; HAFALLA, J.C.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRIGUÉZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infections. **Science**, 291: 141-4, 2001.

NEILL, A.L. & HUNT, N.H. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. **Parasitology**, 105(Pt 2), 165–175, 1992.

NERI-NUMA, I.A.; SANCHO, R.A.S.; PEREIRA, A.P.A.; PASTORE, G.M. Small Brazilian wild fruits: nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, 2017.

OLIVEIRA, M. S. P., CARVALHO, J. E. U, NASCIMENTO, W. M. O. Açaí (*Euterpe oleracea*). Jaboticabal: **FUNEP**, 52p, 2000.

PINTO, W. B. V. R, KO G. M. Teste de Rotarod: Contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. **REBSCAL**, São Paulo, volume 1(2): 202-212, 2012.

PINTO, W. B. V. R., SOUZA P. V. S., KO G. M. Exame neurológico do camundongo. **RESBCAL**, São Paulo, 2(3): 222-227, 2013.

QUEIROZ, N. L., TEIXEIRA, M. M., TEIXEIRA, A. L. Immunopathogenesis of cerebral malaria. **Revista Brasileira de Neurologia**, 44(1): 13-19, 2008.

RIBEIRO, J.C., ANTUNES, L.M., AISSA, A.F., DARIN, J.D.C, DE ROSSO, V.V., MERCADANTE, A.Z., BIANCHI, M.L.P. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea*) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, 695: 22-28, 2010.

ROGERS D. C., PETERS J., MARTIN J. E., BALL S., NICHOLSON S. J., WITHERDEN A. S., HAFEZPARAST M., LATCHAM J., ROBINSON T. L., QUILTER C. A., FISHER A. M. C. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. **Neuroscience Letters**, 396: 89-92, 2001.

ROGEZ, H. Açai: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação. **EDUFPA**: 313p, Belém, Brazil, 2000.

SCHAUSS, A. G., WU, X., PIOR, R. L., OU, B., HUANG, D., KABABIK, J. P., Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 8598-8603, 2006b.

SCHAUSS, A. G., WU, X., PIOR, R. L., OU, B., HUANG, D., ONEWS, J., AGARWAL, A., JENSEN, G. S., HART, A. N., SHANBROM, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 8604-8610, 2006a.

SCHRECKINGER, M. E., LOTTON, J., LILA, M. A., DE MEJIA, E.G. Berries from southamerica: A comprehensive review on chemistry, health potencial and commercialization. **Journal of Medicinal Food**, 13(2): 233-46, 2010.

SENALDI, G.; SHAKLEE, C.L.; GUO, J.; MARTIN, L.; BOONE, T.; MAK, T.W.; ULICH, T.R. Protection against the mortality associated with disease models

mediated by TNF and IFN-gamma in mice lacking IFN regulatory factor-1. **The Journal of Immunology**, 163: 6820-26, 1999.

TUTEJA, R. Malaria: an overview. **FESB Journal**, 274: 4670-4679, 2007.

VAN DER HEYDE, H. C.; NOLAN, J.; COMBES, V.; GRAMAGLIA, I., GRAU, G. E. Aunified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends in Parasitology*, 22(11): 503-8, 2006.

VILLACHICA, H., *et al.* 1998. Frutales y hortalizas promisorias de la Amazonia. Lima: Tratado de Cooperación Amazonica, 96: 367, 1998.

WHEELER, D.L.; CHAPPEY, C.; LASH, A.E.; LEIPE, D.D.; MADDEN, T.L.; SCHULER, G.D.; TATUSOVA, T.A.; RAPP, B.A. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research: Oxford Journals**, 28(1): 10-4, 2000.

WHITE, N.J; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T.T.; FAIZ, M.A.; MOKUOLU, O.A.; DONDORP, A.M. Malaria. **Lancet**; 383: 723–35, 2014.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report**, 2015; 2018.

ANEXO I – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO DE SUBSTÂNCIAS NEUROPROTETORAS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE NA PATOGÊNESE DA MALÁRIA CEREBRAL INDUZIDA PELA INFECÇÃO POR PLASMODIUM BERGHEI (ANKA).", protocolada sob o CEUA nº 6211241117, sob a responsabilidade de **Karen Renata Herculano Matos Oliveira e equipe; Larissa Medeiros dos Anjos; Nívia de Souza Franco Mendes; Brenda Jaqueline de Azevedo Ataíde; Karen Renata Herculano Matos Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 22/03/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE POSSIBLE EFFECT OF NEUROPROTECTORS SUBSTANCES WITH AN ANTIOXIDANT POTENTIAL IN PATHOGENESIS OF CEREBRAL MALARIA INDUCED BY Plasmodium berghei (ANKA) INFECTION.", utilizing 300 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 6211241117, under the responsibility of **Karen Renata Herculano Matos Oliveira and team; Larissa Medeiros dos Anjos; Nívia de Souza Franco Mendes; Brenda Jaqueline de Azevedo Ataíde; Karen Renata Herculano Matos Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 03/22/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2018** a **02/2020**

Área: **Neurofarmacologia Experimental**

Origem:	Biotério Central ICB/UFPA	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	6 a 8 semanas	N:	150
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 25 g		
Linhagem:	Swiss						
Origem:	Biotério Central ICB/UFPA	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	6 a 8 semanas	N:	150
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 25 g		
Linhagem:	Swiss						

Local do experimento: **Laboratório de Neurofarmacologia Experimental**

Belé, 22 de março de 2018

M^a Vivina B. Monteiro

Profa. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Vanessa Joia de Mello

Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

ANEXO II – Tabelas do Protocolo SHIRPA

	Comportamento Motor	Tônus Muscular e Força	Reflexo e Função Sensorial	Estado Neuropsiquiátrico	Função Autônômica
3º d.p.i.	2.5±0.36	1.7±0.07	2.24±0.31	1.60±0.40	0.80±0.42
5º d.p.i.	2.75±0.45	3.0±0.30	2.24±0.31	1.72±0.45	0.57±0.31
7º d.p.i.	2.78±0.46	2.75±0.36	2.30±0.31	1.91±0.57	0.74±0.36
9º d.p.i.	2.75±0.45	2.75±0.36	2.35±0.32	1.91±0.57	0.46±0.29
12º d.p.i.	2.71±0.47	2.75±0.36	2.25±0.31	1.94±0.56	0.64±0.38

Tabela 2: Comprometimento comportamental após inoculação da cepa PbA para indução do quadro de Malária Cerebral Experimental (MCE). O comprometimento foi avaliado em cinco diferentes categorias funcionais: comportamento motor, tônus muscular e força, reflexo e função sensorial, estado neuropsiquiátrico e função autônômica utilizando a tabela primária do SHIRPA. A soma dos escores de todas as categorias foi registrada como uma pontuação total para o grupo Controle (n=7) e os dados estão expressos como média ± SEM.

	Comportamento Motor	Tônus Muscular e Força	Reflexo e Função Sensorial	Estado Neuropsiquiátrico	Função Autonômica
3º d.p.i.	2.5±0.36	1.7±0.07	2.24±0.31	1.60±0.42	0.80±0.42
5º d.p.i.	2.78±0.45	2.75±0.30	2.25±0.31	1.72±0.45	0.59±0.36
7º d.p.i.	2.78±0.45	2.75±0.36	2.30±0.32	1.91±0.57	0.74±0.30
9º d.p.i.	2.75±0.45	2.75±0.36	2.35±0.32	1.91±0.56	0.47±0.30
12º d.p.i.	2.71±0.47	2.75±0.36	2.25±0.31	1.91±0.55	0.64±0.36

Tabela 3: Comprometimento comportamental após inoculação da cepa PbA para indução do quadro de Malária Cerebral Experimental (MCE). O comprometimento foi avaliado em cinco diferentes categorias funcionais: comportamento motor, tônus muscular e força, reflexo e função sensorial, estado neuropsiquiátrico e função autonômica utilizando a tabela primária do SHIRPA. A soma dos escores de todas as categorias foi registrada como uma pontuação total para o grupo Açaí (n=7) e os dados estão expressos como média ± SEM.

	Comportamento Motor	Tônus Muscular e Força	Reflexo e Função Sensorial	Estado Neuropsiquiátrico	Função Autonômica
3º d.p.i.	2.50±0.30	1.70±0.06	2.24±0.26	1.77±0.41	1.00±0.49
5º d.p.i.	2.20±0.31	1.95±0.10	2.24±0.31	1.80±0.41	0.62±0.29
7º d.p.i.	1.80±0.34	1.35±0.23	2.20±0.31	1.35±0.31	0.40±0.31
9º d.p.i.	0.78±0.35	0.62±0.08	2.05±0.43	0.91±0.54	0.33±0.34

Tabela 4: Comprometimento comportamental após inoculação da cepa PbA para indução do quadro de Malária Cerebral Experimental (MCE). O comprometimento foi avaliado em cinco diferentes categorias funcionais: comportamento motor, tônus muscular e força, reflexo e função sensorial, estado neuropsiquiátrico e função autonômica utilizando a tabela primária do SHIRPA. A soma dos escores de todas as categorias foi registrada como uma pontuação total para o grupo PbA (n=10) e os dados estão expressos como média ± SEM.

Parâmetros	Grupo Controle (n=7)	Grupo Açai (n=7)	Grupo PbA (n=10)	Grupo PbA+Açai (n=10)	
Jarra de Observação ("Viewing Jar")					
1	Coloração dos Pêlos	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 10 (100%)	Normal: 10 (100%)
2	Morfologia dos Pêlos	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 10 (100%)	Normal: 10 (100%)
3	Piloereção	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
4	Coloração da Pele	Rosada: 7 (100%)	Rosada: 7 (100%)	Pálida: 10 (100%)	Rosada: 8 (80%) Pálida: 2 (20%)
5	Taxa de Respiração	Normal: 1 (14,28%) Ofegante: 6 (85,71%)	Normal: 4 (57,14%) Ofegante: 3 (42,85%)	Normal: 2 (20%) Ofegante: 8 (80%)	Normal: 8 (80%) Ofegante: 2 (20%)
6	Tremor	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 10 (100%)	Ausente: 10 (100%)
7	Posição do Corpo	Apoiado nas patas traseiras: 7 (100%)	Apoiado nas patas traseiras: 7 (100%)	Plano: 2 (20%) Apoiado nas patas traseiras: 8 (80%)	Plano: 1 (10%) Sentado ou em Pé: 1 (10%) Apoiado nas patas traseiras: 8 (80%)
8	Atividade Espontânea	Movimentos Moderados: 3 (42,85%) Movimentos Rápidos: 4 (57,14%)	Movimentos moderados: 4 (57,14%) Movimentos Rápidos: 3 (42,85%)	Movimentos Moderados: 10 (100%)	Movimentos Lentos: 2 (20%) Movimentos Moderados: 3 (30%) Movimentos Rápidos: 5 (50%)
9	Morfologia da Cauda	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 10 (100%)	Normal: 10 (100%)

1 0	Fechamento das Pálpebras	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 10 (100%)	Normal: 10 (100%)
1 1	Lacrimejamento	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 10 (100%)	Ausente: 10 (100%)
1 2	Salivação	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 10 (100%)	Ausente: 10 (100%)
1 3	Elevação Pélvica	Elevada: 7 (100%)	Elevada: 7 (100%)	Plana: 2 (20%) Normal: 4 (40%) Elevada: 4 (40%)	Plana: 1 (10%) Elevada: 9 (90%)
1 4	Elevação da Cauda	Extendida Horizontalmente: 7 (100%)	Extendida Horizontalmente: 5 (71,42%) Elevada: 2 (28,57%)	Acentuadamente Plana: 1 (20%) Extendida Horizontalmente: 1 (20%) Elevada: 3 (60%)	Acentuadamente Plana: 1 (10%) Extendida Horizontalmente: 8 (80%) Elevada: 1 (10%)
1 5	Ondulação do Tronco	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
Função Motora					
1	Transferência de Ambiente	Freeze temporário/ Movimentos Moderados: 1 (14,28%) Freeze breve/ Movimentos Ativos: 1 (14,28%) Freeze Momentâneo/ Movimentos Ativos: 1 (14,28%) Extremamente excitado: 4 (57,14%)	Sem Freeze/ Movimentos imediatos: 7 (100%)	Freeze temporário/ Movimentos Moderados: 2 (20%) Freeze breve/ Movimentos Ativos: 2 (20%) Freeze momentâneo/ Movimentos ativos: 6 (60%)	Freeze breve/ Movimentos Ativos: 2 (20%) Freeze Momentâneo/ Movimentos Ativos: 6 (60%) Extremamente excitado: 2 (20%)
2	Marcha	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Fluido/Anormal: 4 (40%) Normal: 6 (60%)	Normal: 10 (100%)

3	Atividade Locomotora				
4	Geotaxis Negativa	Cai: 2 (28,57%) Se vira e escala a grade: 5 (71,42%)	Se vira e escala a grade: 7 (100%)	Se vira e escala a grade: 10 (100%)	Cai: 2 (20%) Se vira e escala a grade: 8 (80%)
5	Reflexo de Endireitamento	Sem comprometimento: 7 (100%)	Sem comprometimento: 7 (100%)	Sem comprometimento: 10 (100%)	Sem comprometimento: 10 (100%)
6	Reflexo de Endireitamento / Contato	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
7	Força dos Membros	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 6 (60%) Ausente: 4 (40%)	Presente: 6 (60%) Ausente: 4 (40%)
8	Força ao Agarrar	Moderado/Eficaz: 5 (71,42%) Eficaz: 2 (28,57%)	Semi-eficaz: 1 (20%) Eficaz: 4 (80%)	Semi-eficaz: 2 (40%) Eficaz: 3 (60%)	Semi-eficaz: 4 (40%) Eficaz/Moderado: 6 (60%)
9	Manobra do Arame ("Wire Manoeuvre")	Agarra com os membros inferiores: 7 (100%)	Agarra com os membros inferiores: 7 (100%)	Dificuldade de agarrar com os membros inferiores: 2 (20%) Agarra com os membros inferiores: 8 (80%)	Cai: 2 (20%) Incapaz de levantar os membros inferiores: 2 (20%) Agarra com os membros inferiores: 6 (60%)
Função Sensorial					
1	Escape ao Toque	Vigorosa: 7 (100%)	Vigorosa: 7 (100%)	Vigorosa: 10 (100%)	Vigorosa: 10 (100%)
2	Posicionamento Visual	Contato acima das vibrissas: 3 (42,85%) Contato antes das vibrissas: 4 (57,14%)	Contato acima das vibrissas: 4 (%) Contato antes das vibrissas: 2 (%) Contato vigoroso: 1 (%)	Contato acima das vibrissas: 20 (20%) Contato antes das vibrissas: 6 (60%) Contato vigoroso: 2 (20%)	Contato acima das vibrissas: 5 (50%) Contato antes das vibrissas: 5 (50%)
3	Reflexo Auricular	Retração Ativa: 7 (100%)	Retração Ativa: 7 (100%)	Retração Ativa: 10 (100%)	Retração Ativa: 10 (100%)

("Pinna Reflex")					
4	Reflexo Corneal	Ativo (2 olhos): 7 (100%)	Ativo (2 olhos): 7 (100%)	Ativo (2 olhos): 10 (100%)	Ativo (2 olhos): 10 (100%)
5	Beliscada na pata traseira ("Toe pinch")	Retirada Rápida: 7 (100%)	Retirada Rápida: 7 (100%)	Retirada Rápida: 10 (100%)	Retirada Moderada: 4 (40%) Retirada Rápida: 6 (60%)
Nível de Ansiedade					
1	Mordida	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
2	Medo	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 10 (100%)	Ausente: 10 (100%)
3	Irritabilidade	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
4	Agressão	Provoca mordida ou ataca: 7 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 7 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 10 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 10 (100%)
5	Vocalização	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
6	Convulsão	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 10 (100%)	Ausente: 10 (100%)
Outros					
1	Tônus Corporal	Resistência Leve: 3 (42,85%) Resistência Extrema: 4 (57,14%)	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Leve: 4 (40%) Resistência Extrema: 6 (60%)	Resistência Extrema: 10 (100%)
2	Tônus Abdominal	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Extrema: 10 (100%)	Resistência Extrema: 10 (100%)

Tabela 6: Parâmetros avaliados no 3º dia pós-infecção (d.p.i.) utilizando o protocolo SHIRPA. Adaptado de LACKNER *et al.*, 2016.

Parâmetros	Grupo Controle (n=7)	Grupo Açaí (n=7)	Grupo PbA (n=10)	Grupo PbA+Açaí (n=10)
Jarra de Observação ("Viewing Jar")				
1 Coloração dos Pêlos	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 10 (100%)	Normal: 10 (100%)
2 Morfologia dos Pêlos	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 10 (100%)	Normal: 10 (100%)
3 Piloereção	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
4 Coloração da Pele	Rosada: 7 (100%)	Rosada: 7 (100%)	Pálida: 10 (100%)	Rosada: 8 (80%) Pálida: 2 (20%)
5 Taxa de Respiração	Normal: 1 (14,28%) Ofegante: 6 (85,71%)	Normal: 5 (71,42%) Ofegante: 2 (28,57%)	Normal: 2 (20%) Ofegante: 8 (80%)	Normal: 5 (50%) Ofegante: 5 (50%)
6 Tremor	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 10 (100%)	Ausente: 10 (100%)
7 Posição do Corpo	Apoiado nas patas traseiras: 7 (100%)	Apoiado nas patas traseiras: 7 (100%)	Plano: 2 (20%) Apoiado nas patas traseiras: 8 (80%)	Plano: 2 (20%) Sentado ou em Pé: 2 (20%) Apoiado nas patas traseiras: 6 (60%)
8 Atividade Espontânea	Movimentos Moderados: 3 (42,85%) Movimentos Rápidos: 4 (57,14%)	Movimentos moderados: 2 (28,57%) Movimentos Rápidos: 5 (71,42%)	Movimentos Moderados: 10 (100%)	Movimentos Lentos: 2 (20%) Movimentos Moderados: 3 (30%) Movimentos Rápidos: 5 (50%)
9 Morfologia da Cauda	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 10 (100%)	Normal: 10 (100%)
10 Fechamento das Pálpebras	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 10 (100%)	Normal: 10 (100%)
11 Lacrimejamento	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 10 (100%)	Ausente: 10 (100%)

12	Salivação	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 10 (100%)	Ausente: 10 (100%)
13	Elevação Pélvica	Elevada: 7 (100%)	Elevada: 7 (100%)	Plana: 2 (20%) Normal: 4 (40%) Elevada: 4 (40%)	Plana: 2 (20%) Elevada: 8 (80%)
14	Elevação da Cauda	Extendida Horizontalmente: 7 (100%)	Extendida Horizontalmente: 5 (71,42%) Elevada: 2 (28,57%)	Acentuadamente Plana: 2 (20%) Extendida Horizontalmente: 2 (20%) Elevada: 6 (60%)	Acentuadamente Plana: 1 (10%) Extendida Horizontalmente: 8 (80%) Elevada: 1 (10%)
15	Ondulação do Tronco	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
Função Motora					
1	Transferência de Ambiente	Freeze temporário/ Movimentos Moderados: 1 (14,28%) Freeze breve/ Movimentos Ativos: 2 (28,57%) Freeze Momentâneo/ Movimentos Ativos: 2 (28,57%) Extremamente excitado: 2 (28,57%)	Freeze Momentâneo/ Movimentos Ativos: 5 (71,42%) Sem Freeze/Movimentos imediatos: 2 (28,57%)	Freeze temporário/ Movimentos Moderados: 4 (40%) Freeze breve/ Movimentos Ativos: 6 (60%)	Freeze breve/ Movimentos Ativos: 1 (10%) Freeze Momentâneo/ Movimentos Ativos: 4 (40%) Sem Freeze/Movimentos imediatos: 4 (40%) Extremamente excitado: 1 (10%)
2	Marcha	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Fluido/Anormal: 10 (100%)	Fluido/Anormal: 2 (20%) Normal: 8 (80%)
3	Atividade Locomotora				
4	Geotaxis Negativa	Cai: 2 (28,57%) Se vira e escala a grade: 5 (71,42%)	Se vira e escala a grade: 7 (100%)	Se vira e escala a grade: 10 (100%)	Cai: 2 (20%) Se vira e escala a grade: 8 (80%)
5	Reflexo de Endireitamento	Sem comprometimento: 7 (100%)	Sem comprometimento: 7 (100%)	Sem comprometimento: 10 (100%)	Sem comprometimento: 10 (100%)
6	Reflexo de Endireitamento / Contato	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)

7	Força dos Membros	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 6 (60%) Ausente: 4 (40%)	Presente: 6 (60%) Ausente: 4 (40%)
8	Força ao Agarrar	Moderado/Eficaz: 6 (85,71%) Eficaz: 1 (14,28%)	Semi-eficaz: 1 (14,28%) Eficaz: 6 (85,71%)	Semi-eficaz: 4 (40%) Eficaz: 6 (60%)	Semi-eficaz: 2 (20%) Eficaz/Moderado: 8 (80%)
9	Manobra do Arame ("Wire Manoeuvre")	Agarra com os membros inferiores: 7 (100%)	Agarra com os membros inferiores: 7 (100%)	Dificuldade de agarrar com os membros inferiores: 2 (20%) Agarra com os membros inferiores: 8 (80%)	Cai: 2 (20%) Incapaz de levantar os membros inferiores: 2 (20%) Agarra com os membros inferiores: 6 (60%)

Função Sensorial

1	Escape ao Toque	Vigorosa: 7 (100%)	Vigorosa: 7 (100%)	Vigorosa: 10 (100%)	Vigorosa: 10 (100%)
2	Posicionamento Visual	Contato acima das vibrissas: 1 (14,28%) Contato antes das vibrissas: 5 (71,42%) Contato vigoroso: 1 (14,28%)	Contato antes das vibrissas: 3 (42,85%) Contato vigoroso: 4 (57,14%)	Contato acima das vibrissas: 4 (40%) Contato antes das vibrissas: 6 (60%)	Contato acima das vibrissas: 2 (20%) Contato antes das vibrissas: 8 (80%)
3	Reflexo Auricular ("Pinna Reflex")	Retração Ativa: 7 (100%)	Retração Ativa: 7 (100%)	Retração Ativa: 10 (100%)	Retração Ativa: 10 (100%)
4	Reflexo Corneal	Ativo (2 olhos): 7 (100%)	Ativo (2 olhos): 7 (100%)	Ativo (2 olhos): 10 (100%)	Ativo (2 olhos): 10 (100%)
5	Beliscada na pata traseira ("Toe pinch")	Retirada Rápida: 7 (100%)	Retirada Rápida: 7 (100%)	Retirada Rápida: 10 (100%)	Retirada Moderada: 2 (20%) Retirada Rápida: 8 (80%)

Nível de Ansiedade

1	Mordida	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
2	Medo	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Estático: 2 (20%) Ausente: 80 (80%)	Ausente: 10 (100%)
3	Irritabilidade	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
4	Agressão	Provoca mordida ou ataca: 7 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 7 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 10 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 10 (100%)

5	Vocalização	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 10 (100%)	Presente: 10 (100%)
6	Convulsão	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 10 (100%)	Ausente: 10 (100%)
Outros					
1	Tônus Corporal	Resistência Leve: 3 (42,85%) Resistência Extrema: 4 (57,14%)	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Leve: 4 (40%) Resistência Extrema: 6 (60%)	Resistência Extrema: 10 (100%)
2	Tônus Abdominal	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Extrema: 10 (100%)	Resistência Extrema: 10 (100%)

Tabela 7: Parâmetros avaliados no 5º dia pós-infecção (d.p.i.) utilizando o protocolo SHIRPA. Adaptado de LACKNER *et al.*, 2016.

Parâmetros	Grupo Controle (n=7)	Grupo Açai (n=7)	Grupo PbA (n=6)	Grupo PbA+Açai (n=8)	
Jarra de Observação ("Viewing Jar")					
1	Coloração dos Pêlos	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 4 (66,66%) Alteração da Coloração: 2 (33,33%)	Normal: 6 (75%) Alteração da Coloração: 2 (25%)
2	Morfologia dos Pêlos	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 60 (100%)	Normal: 8 (100%)
3	Piloereção	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 60 (100%)	Presente: 8 (100%)
4	Coloração da Pele	Rosada: 7 (100%)	Rosada: 7 (100%)	Pálida: 60 (100%)	Rosada: 2 (25%) Pálida: 6 (75%)
5	Taxa de Respiração	Normal: 1 (14,28%) Ofegante: 6 (85,71%)	Normal: 5 (71,42%) Ofegante: 2 (28,57%)	Normal: 2 (33,33%) Ofegante: 4 (66,66%)	Normal: 2 (25%) Ofegante: 6 (75%)
6	Tremor	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 6 (100%)	Ausente: 8 (100%)
7	Posição do Corpo	Apoiado nas patas traseiras: 7 (100%)	Apoiado nas patas traseiras: 7 (100%)	Plano: 2 (33,33%) Apoiado nas patas traseiras: 4 (66,66%)	Plano: 1 (12,5%) Sentado ou em Pé: 1 (12,5%) Apoiado nas patas traseiras: 6 (75%)
8	Atividade Espontânea	Movimentos Moderados: 5 (71,42%) Movimentos Rápidos: 2 (28,57%)	Movimentos moderados: 2 (28,57%) Movimentos Rápidos: 5 (71,42%)	Movimentos Lentos: 3 (50%) Movimentos Moderados: 2 (33,33%) Movimentos Rápidos: 1 (16,66%)	Ausente: 6 (75%) Movimentos Lentos: 1 (12,5%) Movimentos Moderados: 1 (12,5%)
9	Morfologia da Cauda	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 6 (100%)	Normal: 8 (100%)
10	Fechamento das Pálpebras	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 6 (100%)	Normal: 8 (100%)
11	Lacrimejamento	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 6 (100%)	Ausente: 8 (100%)
12	Salivação	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 6 (100%)	Ausente: 8 (100%)

13	Elevação Pélvica	Elevada: 7 (100%)	Elevada: 7 (100%)	Plana: 1 (16,66%) Normal: 4 (66,66%) Elevada: 1 (16,66%)	Plana: 2 (25%) Normal: 6 (75%)
14	Elevação da Cauda	Extendida Horizontalmente: 7 (100%)	Extendida Horizontalmente: 5 (71,42%) Elevada: 2 (28,57%)	Extendida Horizontalmente: 5 (83,33%) Elevada: 1 (16,66%)	Extendida Horizontalmente: 7 (87,5%) Elevada: 1 (12,5%)
15	Ondulação do Tronco	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 6 (100%)	Presente: 8 (100%)
Função Motora					
1	Transferência de Ambiente	Freeze temporário/ Movimentos Moderados: 1 (14,28%) Freeze breve/Movimentos Ativos: 1 (14,28%) Freeze Momentâneo/ Movimentos Ativos: 4 (57,14%) Extremamente excitado: 1 (14,28%)	Freeze Momentâneo/ Movimentos Ativos: 5 (71,42%) Sem Freeze/Movimentos imediatos: 2 (28,57%)	Freeze temporário/ Movimentos Moderados: 2 (33,33%) Freeze breve/ Movimentos Ativos: 4 (66,66%)	Freeze breve/ Movimentos Ativos: 1 (12,5%) Freeze Momentâneo/ Movimentos Ativos: 3 (37,5%) Sem Freeze/Movimentos imediatos: 3 (37,5%) Extremamente excitado: 1 (12,5%)
2	Marcha	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Fluido/Anormal: 6 (100%)	Fluido/Anormal: 2 (25%) Normal: 6 (75%)
3	Atividade Locomotora				
4	Geotaxis Negativa	Cai: 2 (28,57%) Se vira e escala a grade: 5 (71,42%)	Se vira e escala a grade: 7 (100%)	Se vira e escala a grade: 6 (100%)	Cai: 2 (25%) Se vira e escala a grade: 6 (75%)
5	Reflexo de Endireitamento	Sem comprometimento: 7 (100%)	Sem comprometimento: 7 (100%)	Sem comprometimento: 6 (100%)	Sem comprometimento: 8 (100%)
6	Reflexo de Endireitamento / Contato	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 6 (100%)	Presente: 8 (100%)

7	Força dos Membros	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 4 (66,66%) Ausente: 2 (33,33%)	Presente: 4 (50%) Ausente: 4 (50%)
8	Força ao Agarrar	Moderado/Eficaz: 6 (85,71%) Eficaz: 1 (14,28%)	Semi-eficaz: 1 (14,28%) Eficaz: 6 (85,71%)	Ausente: 2 (33,33%) Eficaz/Moderado: 2 (33,33%) Eficaz: 2 (33,33%)	Semi-eficaz: 5 (62,5%) Eficaz/Moderado: 3 (37,5%) Eficaz: 1 (12,5%)
9	Manobra do Arame ("Wire Manoeuvre")	Agarra com os membros inferiores: 7 (100%)	Agarra com os membros inferiores: 7 (100%)	Cai: 1 (16,66%) Dificuldade de agarrar com os membros inferiores: 4 (66,66%) Agarra com os membros inferiores: 1 (16,66%)	Dificuldade de agarrar com os membros inferiores: 2 (25%) Incapaz de levantar os membros inferiores: 3 (37,5%) Agarra com os membros inferiores: 1 (12,5%)

Função Sensorial

1	Escape ao Toque	Vigorosa: 7 (100%)	Vigorosa: 7 (100%)	Suave: 6 (100%)	Moderada: 2 (25%) Vigorosa: 6 (75%)
2	Posicionamento Visual	Contato acima das vibrissas: 1 (14,28%) Contato antes das vibrissas: 5 (71,42%) Contato vigoroso: 1 (14,28%)	Contato antes das vibrissas: 5 (71,42%) Contato vigoroso: 2 (28,57%)	Contato acima das vibrissas: 2 (33,33%) Contato antes das vibrissas: 4 (66,66%)	Contato acima das vibrissas: 2 (25%) Contato antes das vibrissas: 6 (75%)
3	Reflexo Auricular ("Pinna Reflex")	Retração Ativa: 7 (100%)	Retração Ativa: 7 (100%)	Retração Ativa: 6 (100%)	Retração Ativa: 8 (100%)
4	Reflexo Corneal	Ativo (2 olhos): 7 (100%)	Ativo (2 olhos): 7 (100%)	Ativo (2 olhos): 6 (100%)	Ativo (2 olhos): 8 (100%)
5	Beliscada na pata traseira ("Toe pinch")	Retirada Rápida: 7 (100%)	Retirada Rápida: 7 (100%)	Retirada Moderada: 2 (33,33%) Rápida: 4 (66,66%)	Retirada Rápida: 8 (100%)

Nível de Ansiedade

1	Mordida	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 6 (100%)	Presente: 8 (100%)
2	Medo	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Estático: 2 (33,33%) Ausente: 4 (66,66%)	Ausente: 8 (100%)
3	Irritabilidade	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 6 (100%)	Presente: 8 (100%)

4	Agressão	Provoca mordida ou ataca: 7 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 7 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 6 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 8 (100%)
5	Vocalização	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 6 (100%)	Presente: 8 (100%)
6	Convulsão	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 6 (100%)	Ausente: 8 (100%)
Outros					
1	Tônus Corporal	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Leve: 6 (100%)	Resistência Leve: 4 (50%) Resistência Extrema: 4 (50%)
2	Tônus Abdominal	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Extrema: 7 (100%)	Flácido: 2 (33,33%) Resistência Leve: 4 (66,66%)	Resistência Leve: 4 (50%) Resistência Extrema: 4 (50%)

Tabela 8: Parâmetros avaliados no 7º dia pós-infecção (d.p.i.) utilizando o protocolo SHIRPA. Adaptado de LACKNER *et al.*, 2016.

Parâmetros	Grupo Controle (n=7)	Grupo Açai (n=7)	Grupo PbA (n=3)	Grupo PbA+Açai (n=4)	
Jarra de Observação ("Viewing Jar")					
1	Coloração dos Pêlos	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Alteração da Coloração: 3 (100%)	Alteração da Coloração: 4 (100%)
2	Morfologia dos Pêlos	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 3 (100%)	Normal: 4 (100%)
3	Piloereção	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 3 (100%)	Presente: 4 (100%)
4	Coloração da Pele	Rosada: 7 (100%)	Rosada: 7 (100%)	Pálida: 3 (100%)	Pálida: 4 (100%)
5	Taxa de Respiração	Normal: 3 (42,57%) Ofegante: 4 (57,14%)	Normal: 5 (71,42%) Ofegante: 2 (28,57%)	Ofegante: 3 (100%)	Ofegante: (100%)
6	Tremor	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Moderado: 3 (100%)	Moderado: 2 (50%) Ausente: 2 (50%)
7	Posição do Corpo	Apoiado nas patas traseiras: 7 (100%)	Apoiado nas patas traseiras: 7 (100%)	Plano: 2 (66,66%) Sentado ou em Pé: 1 (33,33%)	Plano: 4 (100%)
8	Atividade Espontânea	Movimentos Moderados: 3 (42,57%) Movimentos Rápidos: 4 (57,14%)	Movimentos moderados: 2 (28,57%) Movimentos Rápidos: 5 (71,42%)	Ausente: 1 (33,33%) Movimentos Lentos: 1 (33,33%) Movimentos Moderados: 1 (33,33%)	Ausente: 2 (50%) Movimentos Lentos: 2 (50%)
9	Morfologia da Cauda	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 3 (100%)	Normal: 4 (100%)
10	Fechamento das Pálpebras	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Olhos semi-abertos: 1 (33,33%) Normal: 2 (66,66%)	Olhos semi-abertos: 2 (50%) Normal: 2 (50%)
11	Lacrimejamento	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 3 (100%)	Ausente: 4 (100%)
12	Salivação	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 3 (100%)	Ausente: 4 (100%)
13	Elevação Pélvica	Elevada: 7 (100%)	Elevada: 7 (100%)	Plana: 1 (33,33%)	Plana: 4 (100%)

				Normal: 1 (33,33%) Elevada: 1 (33,33%)	
14	Elevação da Cauda	Extendida Horizontalmente: 7 (100%)	Extendida Horizontalmente: 3 (42,57%) Elevada: 4 (57,14%)	Extendida Horizontalmente: 2 (66,66%) Elevada: 1 (33,33%)	Extendida Horizontalmente: 2 (50%) Elevada: 2 (50%)
15	Ondulação do Tronco	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 3 (100%)	Presente: 4 (100%)
Função Motora					
1	Transferência de Ambiente	Sem Freeze/ Movimentos imediatos: 7 (100%)	Sem Freeze/ Movimentos imediatos: 7 (100%)	Freeze Prolongado/ Movimentos Leve: 3 (100%)	Freeze Prolongado/ Movimentos Leve: 4 (100%)
2	Marcha	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Fluido/Anormal: 3 (100%)	Fluido/Anormal: 4 (100%)
3	Atividade Locomotora				
4	Geotaxis Negativa	Se vira e escala a grade: 7 (100%)	Se vira e escala a grade: 7 (100%)	Cai: 2 (66,66%) Se vira e escala a grade: 1 (33,33%)	Cai: 4 (100%)
5	Reflexo de Endireitamento	Sem comprometimento: 7 (100%)	Sem comprometimento: 7 (100%)	Sem comprometimento: 3 (100%)	Sem comprometimento: 4 (100%)
6	Reflexo de Endireitamento / Contato	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 3 (100%)	Presente: 4 (100%)
7	Força dos Membros	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 2 (66,66%) Ausente: 1 (33,33%)	Ausente: 4 (100%)
8	Força ao Agarrar	Eficaz: 7 (100%)	Eficaz: 7 (100%)	Ausente: 1 (33,33%) Semi-eficaz: 2 (66,66%)	Ausente: 4 (100%)
9	Manobra do Arame ("Wire Manoeuvre")	Agarra com os membros inferiores: 7 (100%)	Agarra com os membros inferiores: 7 (100%)	Dificuldade de agarrar com os membros inferiores: 2 (66,66%) Agarra com os membros inferiores: 1 (33,33%)	Cai: 4 (100%)
Função Sensorial					
1	Escape ao Toque	Vigorosa: 7 (100%)	Vigorosa: 7 (100%)	Ausente: 2 (66,66%) Suave: 1 (33,33%)	Ausente: 4 (100%)

2	Posicionamento Visual	Contato acima das vibrissas: 2 (28,57%) Contato antes das vibrissas: 4 (57,14%) Contato vigoroso: 1 (14,28%)	Contato antes das vibrissas: 5 (71,42%) Contato vigoroso: 2 (28,57%)	Ausente: 2 (66,66%) Contato antes das vibrissas: 1 (33,33%)	Ausente: 4 (100%)
3	Reflexo Auricular ("Pinna Reflex")	Retração Ativa: 7 (100%)	Retração Ativa: 7 (100%)	Retração Ativa: 3 (100%)	Retração Ativa: 4 (100%)
4	Reflexo Corneal	Ativo (2 olhos): 7 (100%)	Ativo (2 olhos): 7 (100%)	Ativo (2 olhos): 3 (100%)	Ativo (2 olhos): 4 (100%)
5	Beliscada na pata traseira ("Toe pinch")	Retirada Rápida: 7 (100%)	Retirada Rápida: 7 (100%)	Retirada Moderada: 2 (66,66%) Retirada Rápida: 1 (33,33%)	Ausente: 2 (50%) Retirada Ligeira: 2 (50%)
Nível de Ansiedade					
1	Mordida	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Ausente: 3 (100%)	Presente: 4 (100%)
2	Medo	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Estático: 3 (100%)	Estático: 4 (100%)
3	Irritabilidade	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Ausente: 1 (33,33%) Presente: 2 (66,66%)	Ausente: 4 (100%)
4	Agressão	Provoca mordida ou ataca: 7 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 7 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 3 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 4 (100%)
5	Vocalização	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 3 (100%)	Presente: 4 (100%)
6	Convulsão	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 3 (100%)	Ausente: 4 (100%)
Outros					
1	Tônus Corporal	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Extrema: 7 (100%)	Sem Resistência: 1 (33,33%) Resistência Moderada: 2 (66,66%)	Sem Resistência Leve: 4 (100%)
2	Tônus Abdominal	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Extrema: 7 (100%)	Flácido: 1 (33,33%) Resistência Moderada: 2 (66,66%)	Flácido: 4 (100%)

Tabela 9: Parâmetros avaliados no 9º dia pós-infecção (d.p.i.) utilizando o protocolo SHIRPA. Adaptado de LACKNER *et al.*, 2016.

Parâmetros	Grupo Controle (n=7)	Grupo Açaí (n=7)	Grupo PbA+Açaí (n=2)
Jarra de Observação ("Viewing Jar")			
1 Coloração dos Pêlos	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Alteração da Coloração: 2 (100%)
2 Morfologia dos Pêlos	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 2 (100%)
3 Piloereção	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 2 (100%)
4 Coloração da Pele	Rosada: 7 (100%)	Rosada: 7 (100%)	Pálida: 2 (100%)
5 Taxa de Respiração	Normal: 5 (71,42%) Ofegante: 2 (28,57%)	Normal: 5 (71,42%) Ofegante: 2 (28,57%)	Ofegante: 2 (100%)
6 Tremor	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Moderado: 2 (100%)
7 Posição do Corpo	Apoiado nas patas traseiras: 7 (100%)	Apoiado nas patas traseiras: 7 (100%)	Plano: 2 (100%)
8 Atividade Espontânea	Movimentos Rápidos: 7 (100%)	Movimentos Rápidos: 7 (100%)	Movimentos Lentos: 2 (100%)
9 Morfologia da Cauda	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Normal: 2 (100%)
10 Fechamento das Pálpebras	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Olhos semi-abertos: 2 (100%)
11 Lacrimejamento	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 2 (100%)
12 Salivação	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 2 (100%)
13 Elevação Pélvica	Elevada: 7 (100%)	Elevada: 7 (100%)	Plana: 2 (100%)
14 Elevação da Cauda	Extendida Horizontalmente:	Extendida Horizontalmente: 7	Extendida Horizontalmente: 2

		7 (100%)	(100%)	(100%)
15	Ondulação do Tronco	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 2 (100%)
Função Motora				
1	Transferência de Ambiente	Sem Freeze/ Movimentos imediatos: 7 (100%)	Sem Freeze/ Movimentos imediatos: 7 (100%)	Freeze Prolongado/ Movimentos Leve: 2 (100%)
2	Marcha	Normal: 7 (100%)	Normal: 7 (100%)	Fluido/Anormal: 2 (100%)
3	Atividade Locomotora			
4	Geotaxis Negativa	Se vira e escala a grade: 7 (100%)	Se vira e escala a grade: 7 (100%)	Cai: 2 (100%)
5	Reflexo de Endireitamento	Sem comprometimento: 7 (100%)	Sem comprometimento: 7 (100%)	Sem comprometimento: 2 (100%)
6	Reflexo de Endireitamento / Contato	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 2 (100%)
7	Força dos Membros	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Ausente: 2 (100%)
8	Força ao Agarrar	Eficaz: 7 (100%)	Eficaz: 7 (100%)	Ausente: 2 (100%)
9	Manobra do Arame ("Wire Manoeuvre")	Agarra com os membros inferiores: 7 (100%)	Agarra com os membros inferiores: 7 (100%)	Cai: 2 (100%)
Função Sensorial				
1	Escape ao Toque	Vigorosa: 7 (100%)	Vigorosa: 7 (100%)	Ausente: 2 (100%)
2	Posicionamento Visual	Contato acima das vibrissas: 3 (42,57%) Contato antes das vibrissas: 4 (57,14%)	Contato antes das vibrissas: 5 (71,42%) Contato vigoroso: 2 (28,57%)	Ausente: 2 (100%)
3	Reflexo Auricular ("Pinna Reflex")	Retração Ativa: 7 (100%)	Retração Ativa: 7 (100%)	Retração Ativa: 2 (100%)
4	Reflexo Corneal	Ativo (2 olhos): 7 (100%)	Ativo (2 olhos): 7 (100%)	Ativo (2 olhos): 2 (100%)
5	Beliscada na pata traseira ("Toe pinch")	Retirada Rápida: 7 (100%)	Retirada Rápida: 7 (100%)	Ausente: 2 (100%)

Nível de Ansiedade				
1	Mordida	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Presente: 2 (100%)
2	Medo	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Estático: 2 (100%)
3	Irritabilidade	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Ausente: 2 (100%)
4	Agressão	Provoca mordida ou ataca: 7 (100%)	Provoca mordida ou ataca: 7 (100%)	Ausente: 2 (100%)
5	Vocalização	Presente: 7 (100%)	Presente: 7 (100%)	Ausente: 2 (100%)
6	Convulsão	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 7 (100%)	Ausente: 2(100%)
Outros				
1	Tônus Corporal	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Extrema: 7 (100%)	Sem Resistência Leve: 2 (100%)
2	Tônus Abdominal	Resistência Extrema: 7 (100%)	Resistência Extrema: 7 (100%)	Flácido: 2 (100%)

Tabela 10: Parâmetros avaliados no 12º dia pós-infecção (d.p.i.) utilizando o protocolo SHIRPA. Adaptado de LACKNER *et al.*, 2016.