

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional

WO 2011/140623 A1

PCT

(51) Classificação Internacional de Patentes :
A61K 36/07 (2006.01) *A61P 33/02* (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2011/000147

(22) Data do Depósito Internacional :
11 de Maio de 2011 (11.05.2011)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
PI1002067-5 11 de Maio de 2010 (11.05.2010) BR
014110001570 11 de Maio de 2011 (11.05.2011) BR

(71) Requerentes (*para todos os Estados designados, exceto US*) : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG [BR/BR]; Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2013, CEP:31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais (BR). MINASFUNGI DE BRASIL [BR/BR]; Travessa Dois Mil Cento e Onze, nº 36A, Bairro Ribeiro de Abreu, CEP 31872-403, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Requerentes (*para US únicamente*) : FERRAZ COELHO, Eduardo Antonio [BR/BR]; Rua Ponte Nova, nº 636, apto 301, Bairro Colegio Batista, CEP: 31 1 10-150, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR). CÉSAR BENTO RÉGIS, Wiliam [BR/BR]; Rua Pastor Francisco Pessoa, nº 38., Bairro Barreiro, CEP: 30640-350, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR). GARCIA VALADARES, Diogo [BR/BR]; Rua Irai, nº 214, apto 501 A, Bairro Cidade Jardim, CEP: 30380-725, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR). PEREIRA TAVARES, Carlos Alberto [BR/BR]; Rua Rovigo, nº 501, Bairro Pampulha, CEP: 31340-500, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR). SALLES MOURA FERNANDES, Ana Paula [BR/BR]; Rua Cônego Rocha Franco, nº 120, apto 1000, Bairro Gutierrez, CEP: 30430-000, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR). SILVANO DE OLIVEIRA, Jamil [BR/BR]; Rua Óliver, nº 251, Bairro União, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR). MATOS SANTORO, Marcelo [BR/BR]; Rua Centauro, nº 461, apto 101, Bairro Santa Lúcia, CEP: 30360-310, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).

(Continua na página seguinte)

(54) Title : FORMULATION AGAINST LEISHMANIASIS AND USE THEREOF

(54) Título : FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA E SEU USO

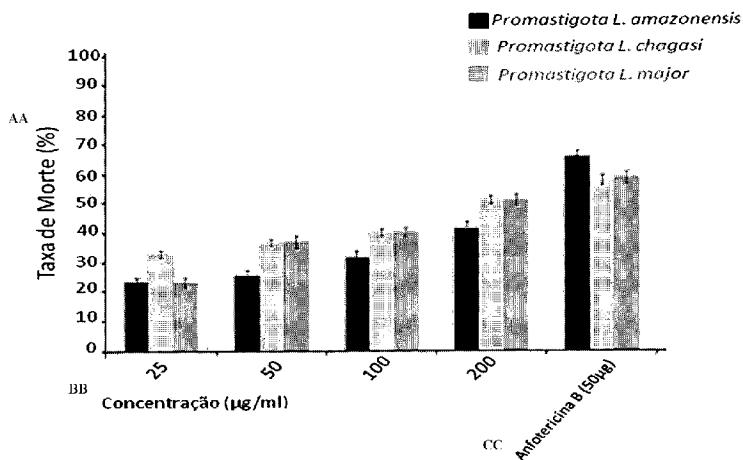


Figura 1

AA Mortality rate (%)
BB Concentration (µg/ml)
CC Amphotericin B (50µg)

(57) Abstract : The present invention relates to the development of pharmaceutical formulations obtained from an aqueous extract of the *Agaricus blazei* mushroom and purified fractions thereof for the treatment of leishmaniasis. In particular, the present invention describes formulations preferably for topical and oral use in the form of solid, semi-solid and liquid pharmaceutical formulations selected in the group comprising gels, creams, ointments, pastes, emulsions in general, solutions, pills and capsules for the treatment of canine and human cutaneous and visceral leishmaniasis.

(57) Resumo :

(Continua na página seguinte)



- (74) **Mandatário** : DE CASTRO LEITE GORI, Ana Luiza; Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2013, CEP:31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais (BR).
- (81) **Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes*) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))
- antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de receção de tais modificações (Regra 48.2(h))

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas obtidas a partir do extrato aquoso do cogumelo Agaricus blazei e suas frações purificadas para o tratamento das leishmanioses. Mais particularmente, a presente invenção descreve formulações preferencialmente para uso tópico e oral, sob a forma de formulações farmacêuticas sólidas, semi-sólidas e líquidas selecionadas de um grupo compreendendo gel, creme, pomada, pastas, emulsões em geral, soluções, comprimidos e cápsulas para o tratamento das Leishmanioses Tegumentar e Visceral canina e humana.

FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA E SEU USO

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas obtidas a partir do extrato aquoso do cogumelo *Agaricus blazei* e suas frações purificadas para o tratamento das leishmanioses. Mais 5 particularmente, a presente invenção descreve formulações preferencialmente para uso tópico e oral, sob a forma de formulações farmacêuticas sólidas, semi-sólidas e líquidas selecionadas de um grupo compreendendo gel, creme, pomada, pastas, emulsões em geral, soluções, comprimidos e cápsulas para o tratamento das Leishmanioses Tegumentar e Visceral canina e humana.

10 O cogumelo *Agaricus blazei* (*A. blazei*) é um fungo aeróbio que tem o potencial de degradar matéria orgânica rica em celulose, hemicelulose e lignina para a obtenção de energia. Esse cogumelo foi reclassificado por Wasser (2002) para *Agaricus brasiliensis*, porém, a denominação de *Agaricus blazei* tem sido a mais usada na literatura científica devido aos aspectos 15 biotecnológicos e medicinais do cogumelo, assim como na maioria dos seus produtos comercializados [WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 60, p. 258-74, 2002); AMAZONAS, M.A.L.A. *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. Heinem.): última visão sobre a polêmica questão da identidade 20 taxonômica de um dos cogumelos mais promissores no mercado mundial. In: Simpósio internacional sobre cogumelos no Brasil, Brasília, DF. p. 78-80, 2004].

O seu valor nutricional e medicinal, aliado a características peculiares como seu sabor, a fragrância de amêndoas e excelente textura, o tornam 25 particularmente adequado para inúmeras aplicações culinárias, sendo um dos cogumelos cultivados mais valorizados no mercado mundial (STIJVE, T., AMAZONAS, M.A.L., GILLER, V. Flavor and taste components of *Agaricus blazei* ss. Heinem: a new gourmet and medicinal mushroom. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, Stuttgart, v. 98, p. 448-453, 2002).

30 Dentre os vários benefícios do *A. blazei* para o organismo humano estão o controle da diabetes do tipo II, da hipertensão arterial e da osteoporose, a recuperação de cálcio por meio do ergosterol, o tratamento do câncer e da AIDS.

Algumas destas propriedades estão relacionadas às substâncias presentes no composto alimentar do *A. blazei*, tais como o beta-D-glucano, cerebrosídeos, esteróides, ergosterol e ácidos graxos (MIZUNO, M., MORIMOTO, M. MINATO, K., TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte 5 T-cell subsets in mice. Biosci. Biotechnol. Biochem., v. 62, p. 434-437, 1998). Sua atividade biológica mais destacada e estudada é a imunoestimulação o que confere proteção contra infecções e ajuda na eliminação de células malignas (URBEN, A.F. Caracterização morfológica e fisiológica de acessos de *Agaricus blazei* e *A. sylvaticus*. In: V Congresso latino americano de micologia, 10 Brasília, p. 203-205, 2005).

O principal mecanismo de ação de *A. blazei* parece estar relacionado com a atividade biológica de polissacarídeos, principalmente, o chamado (1→6)-(1→3)-β-D-glucano, encontrado no corpo de frutificação. Em países como Japão, Rússia, China e Estados Unidos, diferentes polissacarídeos com 15 atividades antitumorais foram extraídos do corpo de frutificação e micélio de várias espécies de cogumelos medicinais. A maioria destes polissacarídeos não atua sobre as células tumorais diretamente, porém produz efeitos antitumorais indiretos devido à ativação de diferentes vias da resposta imunológica do hospedeiro. A ação biológica do consumo de cogumelos 20 observada sobre o sistema imune se deve, principalmente, ao aumento da estimulação e ativação de macrófagos, (WASSER, S.P. & WEIS, A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (review). Int. J. Med., v. 1, p. 31-62, 1999).

A atividade imunoestimulatória de *A. blazei* tem sido caracterizada por 25 diversos grupos de pesquisa (MIZUNO, T. & HAGIWARA, T. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. Agricult Biologic Chemist, Tokyo, v. 54, p. 2889-2896, 1990a; MIZUNO, T., INAGAKI, R., KANAO, R. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from 30 "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. Agric. Biol. Chem., 54, 2897-2905, 1990b; EBINA, T. & FUJIMIYA, Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor

system in mice. *Biotherapy*, v. 11, p. 259-65, 1998; KUO, Y.C., HUANG, Y.L., CHEN, C.C. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 140, p. 176-87, 2002). Estudos utilizando frações solúveis em água a 5 100°C indicaram sua ação inibitória sobre o crescimento de tumores sólidos e de células tumorais, além da redução de metástases As frações estudadas levaram especificamente a um aumento significativo na proliferação de linfócitos T e B *in vitro* e ao aumento da atividade das células NK (DONG Q, YAO J, YANG XT, FANG JN. Structural characterization of a water-soluble 10 beta-D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydr Res.*, v. 3, p.1417-21, 2002; FUJIMIYA Y; SUZUKI Y; OSHIMAN K.; Selective tumoricidal effect of soluble proteoglucan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother.*, v. 46, p. 147-59, 1998). Estudos *in vivo* 15 demonstraram a ação imunoestimulatória dessas frações sobre linfócitos T, indução do aumento da expressão de citocinas e interleucinas (tais como a IL-6 e IL-1β), a diferenciação de células B, aumento da produção de anticorpos e da expressão dos receptores CR3 (Mac-1), B7-1 e CD25, considerados marcadores de superfície celular que reconhecem células tumorais e 20 patógenos (NAKAJIMA, A., ISHIDA, T., KOGA M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol.*, v. 2, p. 1205-11, 2002). Outros estudos demonstraram a inibição de células tumorais pelo *A. blazei* através da ativação imunológica, dependente da via alternativa do complemento, e formação de um complexo 25 opsonizante com C3bi no soro humano (SHIMIZU, S., KITADA, H., YOKOTA, H. Activation of the alternative complement pathway by *Agaricus blazei* murill. *Phytomedic.*, v. 9, p. 536-45, 2002).

Sorimachi e colaboradores (2001) observaram que componentes de *A. blazei* são capazes de ativar macrófagos, resultando em um aumento na 30 produção de citocinas tais como TNF-α, IL-8 e óxido nítrico (NO). Já um extrato aquoso de *A. blazei* aumentou a expressão de mRNA de IL-1β e IL-6, tanto em macrófagos peritoneais quanto nas células esplênicas de camundongos

estimuladas *in vitro* (SORIMACHI, K., AKIMOTO, K., IKEHARA, Y. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* murrill fractions *in vitro*. Cell Struct. Func., v. 26, p. 103-108, 2001; NAKAJIMA, A., ISHIDA, T., KOGA M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill 5 on antibody-producing cells in mice. Int Immunopharmacol., v. 2, p. 1205-11, 2002). Diferentes frações extraídas do extrato aquoso de *A. blazei*, originário da cultura de micélio e do corpo de frutificação, induziram a secreção de citocinas, tais como IL-8 e TNF- α , pelos macrófagos da medula óssea de ratos e o aumento na secreção de NO *in vitro* (Sorimachi e col, 2001). A estimulação 10 das células NK, a geração de células citotóxicas seletivas e a indução de apoptose nas células tumorais *in vitro* pelo extrato de proteoglicanas extraídas do *A. blazei* também foram demonstradas (FUJIMIYA Y; SUZUKI Y; OSHIMAN K.; Selective tumoricidal effect of soluble proteoglucan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation 15 and apoptosis. Cancer Immunol Immunother., v. 46, p. 147-59, 1998). Além da sua atividade antitumoral, estudos têm demonstrado que polissacarídeos de cogumelos têm propriedades antimicrobianas, antivirais, hepatoprotetor, antifibrótico, hipoglicêmico e hipocolesterolêmico (SAKAGAMI, H., AOKI, T., SIMPSON, A. Induction of immunopotentiation activity by a protein-bound 20 polysaccharide, PSK (Review). Anticancer Res., v. 11, p. 993-1000, 1991; SORIMACHI, K., NIWA, A., YAMAZAKI, S. Antiviral activity of water-solubilized lignin derivatives *in vitro*. Agric. Biol. Chem., v. 54, p. 1337-1339, 1990; OOI, V.E.C. Hepatoprotective effect of some mushrooms. Phytother. Res. West Sussex, v. 10, p. 536-538, 1996; PARK, E.J., KO, G., KIM, J. Antifibrotic effects 25 of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, glycyrrhizin, and pentoxifyline in rats with cirrhosis induced in biliary obstruction. Biol. Pharm. Bull., v. 20, p. 417-420, 1997; HIKINO, H. & MIZUNO, T. Hypoglycemic actions of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. Planta Med., v. 55, p. 385, 1989; CHEUNG, P.C.K. The hypocholesterolemic effect of extracellular 30 polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. Nutr. Res., v. 16, p. 1953-1957, 1996).

A presente invenção descreve o emprego do extrato aquoso de *A. blazei* e de suas frações protéicas e não-protéicas purificadas, a partir deste, para o tratamento tópico e oral das leishmanioses Tegumentar e Visceral canina e humana.

5 As leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*, que podem causar desde lesões cutâneas simples, de cura espontânea, até a forma visceral, fatal, quando não tratada (DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., v. 27, p. 305-318, 2004).

10 O parasita *Leishmania* apresenta duas formas morfológicas principais: a promastigota e amastigota. As formas promastigotas são formas alongadas, flageladas, móveis, com núcleo único e cinetoplasto, localizado entre a porção anterior e o núcleo, que se multiplicam no trato digestivo do inseto vetor. As formas amastigotas são formas arredondadas, com flagelo rudimentar, 15 cinetoplasto em forma de bastão, e que se multiplicam no interior das células do sistema fagocítico-monocitário no hospedeiro mamífero (Grimaldi, G.Jr. & Tesh, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev., v. 6, p. 230-250, 1993).

Diferentes espécies de mamíferos, dentre os quais roedores e canídeos, 20 são reservatórios naturais do parasita e servem como fonte de infecção para o vetor. O cão pode ser apontado como o principal reservatório doméstico para a leishmaniose visceral (LV). Raposas e lobos são reservatórios silvestres da doença, enquanto marsupiais e roedores podem ser reservatórios de espécies que causam a leishmaniose tegumentar (LT). Os vetores da doença são 25 flebotomíneos, fêmeas (Díptera: Psicodidae), pertencentes ao gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* em países do Velho Mundo (SACKS, D. & KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu. Rev. Microbiol., v. 55, p. 453-483, 2001).

A infecção pelo vetor ocorre no momento em que a fêmea se alimenta 30 de um hospedeiro infectado quando, juntamente com o sangue, macrófagos contendo formas amastigotas são ingeridos. Ocorre então a liberação das amastigotas no tubo digestivo do vetor que, rapidamente, passam por

alterações bioquímicas e morfológicas e evoluem para a forma promastigota procíclica e, então, à promastigota metacíclica. O hospedeiro mamífero é infectado quando é picado por um vetor contaminado; quando o mesmo injeta as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sob a pele do hospedeiro.

- 5 Essas formas são opsonizadas por proteínas do sistema do complemento ou anticorpos e/ou fagocitadas por macrófagos, formando os fagolisossomos, onde se transformam em amastigotas. Após sucessivas replicações por divisão binária, o parasita pode causar a lise dos macrófagos e consequente liberação dos mesmos. As amastigotas podem ser fagocitadas por novos macrófagos,
- 10 finalizando o ciclo de infecção no hospedeiro mamífero, ou podem ser ingeridas por outro vetor, completando, assim, o ciclo biológico do parasita (Grimaldi, G.Jr. & Tesh, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev., v. 6, p. 230-250, 1993; Sacks, D. & Sher, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat. Immunol., v. 3, p. 1041-1047, 2002.)

Diversas espécies de *Leishmania* já foram descritas, podendo ser apontadas como causadoras de diferentes formas clínicas da doença. A LT caracteriza-se por uma diversidade de manifestações clínicas e de espécies causadoras da doença. No Brasil, ela pode ocorrer devido à infecção por 20 *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. shawi*, *L. laionii* e *L. naiffi* podendo, clinicamente, apresentar-se de forma localizada ou disseminada. A forma cutânea da leishmaniose tegumentar caracteriza-se pela existência de uma lesão única com bordas elevadas, de fundo granuloso e indolor. Lesões vegetantes, verrucosas ou infiltrativas são menos frequentes 25 (MARZOCHI, M.C., MARZOCHI, K.B., CARVALHO, R.W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. Parasitol. Today, v. 10, p. 34-37, 1994; DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., v. 27, p. 305-318, 2004; Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American 30 cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. V. 99, p. 239-251, 2004). Existem ainda casos de leishmaniose mucocutânea, que ocorrem em diversos países e

são causados pelas espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Nesta forma, as lesões apresentam caráter infiltrativo que podem ulcerar e sangrar. A forma cutâneo-difusa ocorre devido à infecção pela espécie *L. aethiopica*, existente na África ou pelas espécies *L. amazonensis* e 5 *L. mexicana* em países da América do Sul. É uma forma em que as lesões podem apresentar-se como placas, nódulos, às vezes vegetantes, mas que raramente ulceram. As lesões disseminam-se em regiões expostas do corpo e tal quadro pode estar associado à ineficiência ou ausência de uma resposta imune efetiva pelo hospedeiro (WEIGLE, K. & SARAVIA, N.G. Natural history, 10 clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. Clin. Dermatol., v. 14, p. 433-450, 1996.; Desjeux, 2004).

Dados da Organização Mundial de Saúde indicam haver incidência dessa doença em cerca de 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. A incidência anual estimada é de cerca de 1.0 a 1.5 milhões 15 de novos casos de LT e cerca de 500 mil casos de LV. Cerca de 350 milhões de pessoas estão em áreas de risco para infecção e estima-se o aumento do número de casos em todo o mundo nos próximos anos (SHAW, J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. A mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 102, p. 541-7, 2007).

20 Outro aspecto que tem apresentado importância clínica e epidemiológica é a co-infecção entre o vírus HIV e *Leishmania*. As leishmanioses podem modificar a progressão da doença causada pelo HIV e facilitar a imunossupressão causada pelo vírus levando à progressão da doença, em diversos países do mundo.

25 O tratamento do homem doente por leishmanioses deve ser realizado para se evitar a mortalidade causada pela LV e reduzir a morbidade provocada pelas lesões desfigurantes observadas nas formas mais severas de LT. Normalmente, o tratamento consiste na aplicação local ou sistêmica de compostos antimoniais pentavalentes, dos quais o estibogluconato de sódio 30 (Pentostam®, Glaxo Wellcome, Inglaterra) e o N-metil antimoniato de meglumina (Glucantime®, Rhône Poulenc Rorer, França) são os mais utilizados (CARVALHO, P.B.; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis. What

do we know about its chemotherapy? Braz. J. Pharmac. Sci., v. 36, p. 69-96, 2000. FRANKE, E.D.; WIGNALL, F.S.; CRUZ, M.E.; ROSALEZ, E.; TOVAR, A.A.; LUCAS, C.M.; LIANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J.D. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. Ann. Intern. Med., 5 v. 113, p. 934-940, 1990. HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. Lancet, v. 354, p. 1191-1199, 1999).

No Brasil, o Glucantime® tem sido utilizado como fármaco de escolha. Entretanto, tal fármaco pode interagir com sulfidrilas de proteínas celulares do hospedeiro causando perda de função e/ou formando complexos com 10 ribonucleosídeos, o que torna a ação do produto inespecífica em relação às células infectadas e àquelas não-infectadas. Fármacos de segunda linha, como a anfotericina B, têm sido recomendados nos casos de intolerância ou resistência ao tratamento convencional, devendo ser administrados exclusivamente em ambiente hospitalar (SUNDAR, S., SINGH, A., AGARWAL, 15 D., RAI, M., AGARWAL, N., CHAKRAVARTY, J. Safety and efficacy of high-dose infusions of a preformed amphotericin B fat emulsion for treatment of Indian visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 80, p. 700-3, 2009).

O tratamento humano com antimoniais pentavalentes possui diversas limitações que reduzem a adesão do paciente ao mesmo, dentre elas a longa duração do tratamento (20 a 40 dias, com aplicações diárias dos produtos), as 20 vias de aplicação dos fármacos (intramuscular ou endovenosa) e os efeitos colaterais graves provocados pelo uso dos fármacos. Altas doses diárias, necessárias no curso do tratamento, podem causar fadiga, artralgias, mialgias além de toxicidade renal (insuficiência renal crônica), hepática (cirroses) e 25 cardíaca (arritmias). Pode-se citar ainda a dificuldade de transporte dos pacientes, que normalmente residem em áreas rurais, até os centros mais especializados de saúde, além do custo elevado dos fármacos (CARVALHO, P.B.; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? Braz. J. Pharmac. Sci., v. 36, p. 69-96, 2000. GROGL, 30 M.; MARTIN, R.K.; ODUOLA, A.M.J.; MILHOUS, W.K.; KYLE, D.E. Characteristics of multidrug resistance in *Plasmodium* and *Leishmania*: detection of P-glycoprotein-like components. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 45, p.

98-111, 1991. TAVARES CA, FERNANDES AP, MELO MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn.* v. 3, p. 657-667, 2003). Tais aspectos dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento, sendo comum o abandono ou a interrupção do mesmo, o que leva ao aumento da resistência 5 do parasita aos fármacos utilizados.

Cunningham (2002) relatou que cerca de 10 a 25% dos pacientes com LV, tratados com antimoniais pentavalentes, apresentaram resistência ao tratamento ou casos de recidiva. Sundar (2001) também relatou que uma porcentagem significativa de pacientes com a doença visceral causada por *L. 10 donovani* apresentaram resistência ao tratamento com Pentostam®(CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.*, v. 72, p. 131-141, 2002. Para estes casos, a pentamidina e anfotericina B podem ser utilizadas, apesar da toxicidade elevada e do alto custo desses fármacos (Grimaldi & Tesh, 1993).

15 Os cães são importantes reservatórios no ciclo doméstico da LV e são considerados a principal fonte de infecção para os flebotomíneos devido à forte prevalência da infecção canina, quando comparada à infecção humana. Cães infectados, mesmo assintomáticos, apresentam grande quantidade de parasitos na pele o que favorece a infecção do inseto vetor, a partir deste 20 reservatório e, consequentemente, a transmissão ao homem. Cabe ressaltar que a infecção humana não tem impacto no ciclo biológico como importante fonte de infecção (Tesh, 1995 e WHO, 2003). Este fato, associado à letalidade da LV na ausência do tratamento, levou o Ministério da Saúde do Brasil a adotar a eliminação de cães quando soropositivos para antígenos de 25 *Leishmania*, como medida de controle da infecção. Entretanto, técnicas sorológicas, como RIFI e ELISA, usualmente utilizadas para diagnosticar a doença no cão, podem apresentar sensibilidade e especificidade variadas e, desta forma, serem subestimadas as taxas reais de infecção. Isso permite a manutenção de animais infectados, sendo este um dos motivos do insucesso 30 no controle da doença (Tesh, 1995).

Fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da LV canina como o alopurinol, os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B não são viáveis

como medida de controle da doença, pois têm preço elevado e, frequentemente, cães tratados e clinicamente curados sofrem recidivas, permanecendo como fontes de infecção para o vetor (Tesh, 1995). Além disso, o uso dessas drogas no tratamento em massa da LV canina traz outra 5 preocupação que é o possível aumento do risco de seleção de linhagens resistentes a tais fármacos que também são utilizados para tratar o homem (Reithinger *et al.*, 2002).

Pelo diversos fatos expostos, ressalta-se a necessidade de novas pesquisas voltadas para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para o 10 tratamento do homem e de cães contra a doença.

Assim, a identificação de novos compostos/produtos/fármacos que sejam menos tóxicos aos pacientes, economicamente mais viáveis, fato que não é observado nos fármacos atualmente utilizados; e cuja via de administração seja melhorada a fim de provocar o menor desconforto possível aos pacientes, 15 torna-se bastante atrativo..Neste sentido, a utilização do fungo *Agaricus blazei*, na forma de seu extrato aquoso e/ou suas frações purificadas presentes em formulações farmacêuticas contendo tais produtos,propõe-se a minimizar e/ou solucionar tais problemas.

Quando se trabalha com o extrato aquoso, o objetivo é incorporá-lo à 20 uma formulação, para tal, o primeiro passo é colocá-lo em uma formulação compatível com seus constituintes, que mantenha sua estabilidade e auxilie sua ação farmacológica. Além disso, existem trabalhos na literatura relacionando a não-toxicidade do fungo quando utilizado em pacientes humanos pela via oral, não sendo constatado nenhum efeito colateral ou tóxico 25 nos indivíduos. Assim, a administração do extrato do fungo e de suas frações por via tópica (para LT) não pode ser considerada invasiva e, com certeza, será muito menos desconfortável ao paciente quando comparada às vias normalmente utilizadas para os antimoniais, no caso, a intramuscular e endovenosa. Além disso, formulações farmacêuticas na forma sólida e/ou 30 líquida também serão desenvolvidas para a administração oral no caso do tratamento da LV.

Além de todas estas vantagens, temos ainda o fato do fungo ser abundante em nossa flora e estar atualmente liberado pela ANVISA para comercialização na forma de nutracêutico.

Breve Descrição da Figuras

5 **Figura 1:** Atividade leishmanicida do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* sobre formas promastigotas em fase estacionária de três espécies de *Leishmania*. Parasitas (4×10^5) foram incubados com concentrações variadas (25 a 200 $\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso por 24 horas e a 25°C. A viabilidade dos parasitas foi determinada por ensaios usando o reagente MTT. As barras 10 representam a média e o desvio-padrão das 3 espécies.

15 **Figura 2:** Atividade leishmanicida do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* sobre formas *like*-amastigotas em fase estacionária de três diferentes espécies de *Leishmania*. Parasitas (4×10^5) foram incubados com concentrações variadas (25 a 200 $\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso por 24 horas e a 25°C. Após, a viabilidade 20 dos parasitas foi determinada por ensaios usando o reagente MTT. As barras representam a média e o desvio-padrão das 3 espécies.

25 **Figura 3:** Inibição da infecção de macrófagos peritoneais por formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*. Os parasitas (4×10^6) foram tratados com 200 $\mu\text{g/mL}$ do extrato aquoso do fungo e incubados por 1 h a 25°C e, posteriormente, colocados para infectar 30 macrófagos (proporção de 10 *Leishmanias* para 1 macrófago) (B). Como controle, parasitas não-tratados foram infectados (A). Os dados são representativos de três experimentos com resultados similares.

30 **Figura 4:** Inibição da infecção de macrófagos peritoneais por formas *like*-amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*, após o tratamento dos parasitas com o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*. Os parasitas foram tratados com 200 $\mu\text{g/mL}$ do extrato do fungo e incubados com macrófagos peritoneais aderidos a lamínulas estéreis, na proporção de 10 *Leishmanias* para cada macrófago. Como controle, parasitas não-tratados foram utilizados na infecção das células macrofágicas. Os resultados são representativos de três experimentos com resultados similares..

Figura 5: Tratamento de macrófagos infectados. Macrófagos peritoneais foram infectados com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, *L. major* ou *L. chagasi*, na proporção de 10 parasitas para cada macrófago e tratados por 48 hs a 25°C com 200 µg/mL do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* (A). Como controle do experimento, células foram infectadas e não receberam tratamento (B).

Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% das frações do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*. As frações são indicadas como: **F1**: < 3.0 kDa; **F2**: entre 3.0 e 10.0 kDa; **F3**: entre 10 e 50 kDa; **F4**: entre 50 e 100 kDa e **F5**: acima de 100 kDa. As amostras foram diluídas em tampão de amostra em condições não-redutoras, homogeneizadas e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada por 4 h, a 80 Volts. O gel foi corado pela prata e fotografado. **PM** corresponde ao padrão de peso molecular (Pharmacia Biotech®).

Figura 7: Atividade leishmanicida das frações purificadas sobre formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*. O experimento foi realizado pelo protocolo de viabilidade celular empregando-se o reagente MTT e a concentração de 50 µg/mL do extrato aquoso do fungo e das frações purificadas foram utilizadas. Como controle, a anfotericina B na concentração de 50 µg/mL foi utilizada. As barras indicam a média e desvio-padrão dos grupos experimentais. O gráfico é representativo de três experimentos com resultados similares.

Figura 8: Atividade leishmanicida das frações F4 e F5 purificadas do fungo *A. blazei*. Macrófagos peritoneais foram infectados na proporção de 10 parasitas para 1 célula, por 4 h e a 25°C. Após, as culturas foram lavadas e mantidas por 24 h. Em seguida, as culturas de macrófagos infectados foram tratados por 48 h com as frações F4 ou F5. O experimento foi realizado em duplicata e 100 macrófagos por lâmina foram quantificados, sendo determinada a porcentagem de morte de parasitas no interior dos macrófagos.

Figura 9: Dosagem de óxido nítrico (NO) em macrófagos tratados com as frações F3, F4 e F5. Macrófagos peritoneais murinos (5×10^5) foram tratados com 50 µg/mL das frações F3, F4 ou F5 por 48 horas e 25°C. Em seguida, a

produção de NO foi determinada pela reação de Griess. Como controle, a concanavalina A (ConA) foi utilizada. As barras representam a média e o desvio-padrão de três experimentos com resultados similares.

Figura 10: Citotoxicidade das frações F4 e F5 purificadas do extrato aquoso do fungo *A. blazei* sobre macrófagos peritoneais murinos. Macrófagos foram tratados por 24 h e 25°C com as frações F4 e F5. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT.

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 10% das frações purificadas a partir da fração F5 por cromatografia de troca iônica. As amostras foram diluídas em tampão de amostra em condições não-redutoras, homogeneizadas e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 80 Volts, por 4 h. O gel foi corado pela prata e fotografado. PM corresponde ao padrão de peso molecular (Pharmacia Biotech®).

Figura 12: Atividade leishmanicida das frações purificadas a partir da fração F5 sobre formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*. O experimento foi realizado pelo protocolo de viabilidade celular empregando-se o reagente MTT e a concentração de 20 µg/mL das frações foi utilizada. Como controle, a anfotericina B foi utilizada na concentração de 50 µg/mL. As barras indicam a média e desvio-padrão dos grupos experimentais. O gráfico é representativo de três experimentos que apresentaram resultados similares.

Figura 13: Citotoxicidade das frações purificadas por troca iônica, a partir da fração F5, sobre macrófagos peritoneais murinos. Macrófagos foram tratados por 24 h e a 25°C com as novas frações purificadas (10 µg/mL). A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT.

Figura 14: Tamanho médio das lesões nas patas infectadas de camundongos BALB/c desafiados com *L. amazonensis* e tratados com o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*.

Figura 15: Tamanho médio das lesões nas patas infectadas de camundongos BALB/c desafiados com *L. amazonensis* e tratados com a fração F5 purificada do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*.

Figura 16: Carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e submetidos a diferentes tratamentos com o extrato aquoso de *Agaricus blazei*.

Figura 17: Carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e submetidos a diferentes tratamentos com a fração F5 do extrato aquoso de *Agaricus blazei*.

Descrição Detalhada da Tecnologia

A presente invenção caracteriza-se pelo uso do extrato aquoso de *Agaricus blazei* e de suas frações protéicas e não-protéicas derivadas, combinados com excipientes farmaceuticamente aceitáveis no tratamento canino e humano das Leishmanioses Tegumentar e Visceral. Mais particularmente, a presente invenção descreve composições preferencialmente de uso tópico e oral, sob as formas farmacêuticas sólidas, semi-sólidas e líquidas selecionadas do grupo compreendendo gel, creme, pomada, pastas, emulsões em geral e soluções, comprimidos e cápsulas.

Essas composições podem ser administradas pelas vias oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados; sendo preferencialmente administradas por via tópica.

A tecnologia aqui proposta poderá ser mais bem compreendida através dos seguintes exemplos, não-limitantes:

Exemplo 1 - Cultura dos Parasitas

As cepas IFLA/BR/1967/PH-8 de *L. amazonensis*, MHOM/BR/1970/BH46 de *L. chagasi* e MHOM/IL/1980/Friedlin de *L. major* foram utilizadas. Os parasitas foram cultivados em meio de cultura de Schneider's completo, o qual é constituído pelo meio de Schneider's (Sigma) acrescido com 20% de soro fetal bovino (Sigma) inativado, 20 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de gentamicina, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7.4. Os parasitas permaneceram em cultivo a 25°C, sendo que repiques das culturas foram efetuados para a manutenção das

cepas e obtenção das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento.

Exemplo 2 - Preparo do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*

Para o preparo dos extratos nas formas aquosa do fungo *Agaricus blazei*, cerca de 1 grama do fungo é pesado e triturado em 1 mL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.0. Após 1 h de incubação a 4°C, o extrato foi centrifugado a 9000 rpm (centrífuga SORVAL LC5C) por 1 h 30 minutos e o sobrenadante foi recuperado e sua concentração estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976)..

10 Exemplo 2.1- Testes biológicos realizados com o extrato aquoso do fungo

Ensaio da atividade leishmanicida com o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*

Foi testada a atividade leishmanicida do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* sobre formas promastigotas em fase estacionária e *like-amastigotas* de três diferentes espécies de *Leishmania*.

Em uma placa de cultura celular de 96 poços (Nunc, Nunclon®), 4×10^5 formas promastigotas e *like-amastigotas* das espécies *Leishmania amazonensis*, *L. major* e *L. chagasi* foram incubadas com 25 a 200 µg/mL do extrato aquoso do fungo, em meio RPMI-PR para um volume final de 100 µL, durante 24 h e a 25°C. Então, 50 µL do reagente MTT (*Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide* 98%; na concentração estoque de 5 mg/mL) foi adicionado e a placa foi incubada por 4 horas e a 25°C. As células foram analisadas em um microscópio para a verificação da formação de cristais de formazan. Logo após, 60 µL de uma solução SDS 10%/HCL 0.1 M foram adicionados para a solubilização dos cristais de formazan e a placa foi incubada por 18 h. As leituras das absorbâncias foram então realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nanômetros (nm) (ver figura 1e 2; Tabela 1 e 2).

Por meio das leituras das absorbâncias coletadas nos experimentos, as Tabela 1 e 2 foram geradas para representar os percentuais da atividade leishmanicida do extrato aquoso contra as três espécies de *Leishmania* nas

duas formas testadas. O cálculo da porcentagem de morte dos parasitas foi baseado na fórmula abaixo, utilizando as leituras das absorbâncias:

$$\text{Taxa de morte} = \frac{(\text{D.O.}_{570\text{nm}} \text{ controle} - \text{D.O.}_{570\text{nm}} \text{ amostra}) \times 100}{\text{D.O.}_{570\text{nm}} \text{ controle}}$$

5

Tabela 1: Média da porcentagem de morte de parasitas utilizando o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* em diferentes concentrações sobre as formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*. Os dados são representativos de três experimentos com resultados similares.

Concentração (ug/mL)	% Morte <i>L. amazonensis</i>	% Morte <i>L. major</i>	% Morte <i>L. chagasi</i>
25	23,7	23,24	33,24
50	25,67	37,2	37
100	31,86	40,41	40,41
200	41,76	51,46	51,46

10

Tabela 2: Média da porcentagem de morte dos parasitas utilizando o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* em diferentes concentrações sobre as formas *like-amastigotas* de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*. Os dados são representativos de três experimentos com resultados similares.

Concentração (ug/mL)	% Morte <i>L. amazonensis</i>	% Morte <i>L. major</i>	% Morte <i>L. chagasi</i>
25	26,44	43,2	39,28
50	28,95	48,4	41
100	35	51,6	44
200	45	55,6	51,57

15

As concentrações efetivas para inviabilizar 50% de *Leishmanias* (CE₅₀) foram determinadas com base nos resultados de atividade leishmanicida sobre

as formas promastigotas e *like*-amastigotas de *Leishmania* e são mostrados na tabela 3.

Tabela 3: Concentração efetiva (CE_{50}) do extrato aquoso de *A. blazei* sobre formas promastigotas e *like*-amastigotas de *Leishmania* sp.

Parasitas	Concentração efetiva (CE_{50})
Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	136
<i>Like</i> -amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	124
Promastigotas de <i>L. chagasi</i>	105
<i>Like</i> -amastigotas de <i>L. chagasi</i>	99
Promastigotas de <i>L. major</i>	138
<i>Like</i> -amastigotas de <i>L. major</i>	89

5 **Eficácia do extrato do fungo em inibir a entrada de parasitas em macrófagos de mamíferos**

Para a verificação da eficácia do extrato do fungo em inibir a entrada de parasitas em macrófagos de mamíferos, formas promastigotas e *like*-amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* foram tratadas com o extrato aquoso do fungo e posteriormente incubadas com macrófagos peritoneais oriundos de camundongos BALB/c, na proporção de 10:1. Os parasitas (4×10^6) foram tratados com 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato aquoso do fungo e incubados por 1 h a 25°C e, posteriormente, colocados para infectar macrófagos (proporção de 10 *Leishmanias* para 1 macrófago) (B). Como controle, parasitas não-tratados foram infectados (A). Os dados são representativos de três experimentos com resultados similares.

Foi feita a quantificação dos macrófagos infectados e determinado o número de parasitas por macrófago infectado, com uso de um microscópio composto. Os resultados são mostrados nas figuras 3 (promastigotas) e 4 (*like*-amastigotas).

Após, a porcentagem do número de macrófagos infectados por formas promastigotas e *like*-amastigotas e a relação entre o número de parasitas por

macrófago infectado foram determinados. Os dados são mostrados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Porcentagem do número de macrófagos infectados com formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* e a relação entre o número de parasitas por macrófago infectado após o tratamento com o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*.

	% Φ infectados	Nº parasitas/Φ
<i>L. amazonensis</i>	84	12
<i>L. amazonensis</i> + 200ug/mL Ab	42	5
<i>L. chagasi</i>	77	9,2
<i>L. chagasi</i> + 200ug Ab	62	4
<i>L. major</i>	64	5,4
<i>L. major</i> + 200ug de Ab	31	2,8

Tabela 5: Porcentagem do número de macrófagos infectados com formas *like-*amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* e a relação entre o número de parasitas por macrófago infectado após o tratamento com o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*.

	% Φ infectados	Nº parasitas/Φ
<i>L. amazonensis</i>	60	3,7
<i>L. amazonensis</i> + 200ug/mL Ab	35,8	1,9
<i>L. chagasi</i>	62	6
<i>L. chagasi</i> + 200ug Ab	37	3,3
<i>L. major</i>	65,6	6
<i>L. major</i> + 200ug de Ab	31	3,6

Efeito do extrato em macrófagos infectados

Macrófagos peritoneais foram infectados com *Leishmania* e, posteriormente, tratados com o extrato aquoso do fungo para verificar a redução da infecção nas células parasitadas.

5 Macrófagos peritoneais, obtidos de camundongos BALB/c, foram infectados com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, *L. major* ou *L. chagasi*, na proporção de 10 parasitas para cada macrófago e tratados por 48 h e a 25°C com 200 µg/mL do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* (A). Como controle, células foram infectadas e
10 não receberam o tratamento (B). Os resultados são mostrados na figura 5.

Exemplo 2.1 - Obtenção de frações protéicas a partir do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*.

Para a preparação e extração das frações protéicas a partir do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*, aproximadamente 28 gramas do cogumelo (sendo usado o corpo de frutificação), fresco e limpo, foram adicionados em 50 mL de água milli-Q acrescido com 50 µL de coquetel de inibidor de protease (SIGMA, código P8340). O material foi macerado em banho de gelo, com auxílio de um graal e pistilo. Posteriormente, o conteúdo permaneceu em repouso a 4°C por 1 h e foi filtrado em papel filtro para a retirada do material não-solubilizado.
15
20

O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado em uma coluna com Amicon de 100.000 Dáltons (Da) na velocidade de 6.000 rpm por 45 minutos e a 4°C. Após, o material retido no filtro foi retirado e o restante do mesmo foi transferido para um novo Amicon de 50.000 Da e centrifugado a 6.000 rpm por 30 minutos e a 4°C. O material retido foi recolhido e o restante foi passado para um novo tubo Amicon de 10.000 Da. As amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o material retido foi retirado, sendo o restante aplicado em Amicon de 3.000 Da. O mesmo procedimento de centrifugação foi repetido e o material retido na membrana para 3.000 Da foi retirado, sendo o restante do material liofilizado.
25
30

Em seguida, as amostras foram quantificadas pelo método de Lowry e utilizadas nos próximos ensaios biológicos (Tabela 6).

Tabela 6: Obtenção das frações protéicas do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* por coluna de Amicon. As frações protéicas foram separadas por gradiente de centrifugação e quantificadas pelo método de Lowry.

	Massa molecular (Dáltons)	Concentração final (mg/mL)
F1	Menor que 3.000	0.8
F2	Entre 3.000 e 10.000	2.3
F3	Entre 10.000 e 50.000	6.57
F4	Entre 50.000 e 100.000	2.5
F5	Acima de 100.000	44.0

Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% das frações purificadas do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*

Após a purificação em colunas de Amicon, as novas frações foram submetidas a uma eletroforese em gel SDS-PAGE a 10% para verificação de seu perfil protéico, conforme demonstrado na figura 6, na qual 2 géis são mostrados.

Exemplo 2.2- Atividade leishmanicida das novas frações purificadas sobre formas promastigotas em fase estacionária de crescimento

As frações foram testadas quanto a sua atividade leishmanicida sobre formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* e os resultados estão representados na figura 7.

O experimento foi realizado pelo protocolo de viabilidade celular empregando-se o reagente MTT e a concentração de 50 µg/mL do extrato

aquoso do fungo e das frações purificadas foram utilizadas. Como controle, a anfotericina B na concentração de 50 µg/mL foi utilizada (figura 7).

Utilizando as leituras das absorbâncias coletadas no experimento anterior, uma tabela foi gerada para representar os percentuais da atividade leishmanicida do extrato aquoso do fungo e de suas frações protéicas purificadas sobre as formas promastigotas em fase estacionária de crescimento das três espécies de *Leishmania*. Os dados estão representados na tabela 7.

Tabela 7: Porcentagem de morte das formas promastigotas em fase estacionária de *Leishmania amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* utilizando o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* e suas frações purificadas. Anfotericina B foi usada como controle do experimento. Os resultados indicam a média ± desvio padrão dos grupos experimentais. Os dados mostrados são representativos de três experimentos com resultados similares.

	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. major</i>	<i>L. chagasi</i>
Extrato aquoso	20,08 ± 4,27	25,46 ± 3,20	18,98 ± 1,27
F1	28,41 ± 1,65	19,78 ± 2,20	27,35 ± 3,96
F2	19,66 ± 2,54	14,63 ± 0,86	8,37 ± 0,74
F3	32,27 ± 1,37	19,60 ± 3,00	12,36 ± 0,94
F4	69,41 ± 0,20	50,51 ± 1,83	75,60 ± 1,19
F5	53,9 ± 0,68	27,76 ± 3,34	49,32 ± 1,58
Anfotericina B	40,06 ± 1,17	42,51 ± 2,00	35,12 ± 2,61

Testes biológicos com as frações F4 e F5

Constatando-se que as frações F4 e F5 apresentaram os melhores resultados de morte sobre as diferentes espécies de *Leishmanias*, as mesmas foram selecionadas para a continuidade dos experimentos. Suas concentrações efetivas para inviabilizar 50% dos parasitas foram calculadas e são mostrados na tabela 8.

Tabela 8: Concentração efetiva (EC_{50}) das frações F4 e F5 do extrato aquoso do fungo *A. blazei* sobre formas promastigotas de *Leishmania spp*

Promastigotas	EC_{50} F4 ($\mu\text{g/mL}$)	EC_{50} F5 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>L. amazonensis</i>	23,5 ($\pm 1,5$)	36,5 ($\pm 3,3$)
<i>L. chagasi</i>	25,1 ($\pm 2,0$)	38,7 ($\pm 2,8$)
<i>L. major</i>	35,8 ($\pm 1,3$)	64,7 ($\pm 2,7$)

Macrófagos peritoneais foram infectados com parasitas, na proporção de 10 parasitas para cada célula, e, posteriormente, tratados com as frações F4 e 5 F5. Os resultados são mostrados na figura 8. Com o intuito de investigar se o mecanismo de atividade leishmanicida dos macrófagos após a estimulação com as frações purificadas ocorria pela produção de óxido nítrico (NO), macrófagos infectados ou não foram estimulados com as frações F3, F4 e F5 e a produção de NO foi determinada pela reação de Griess. Os resultados são 10 mostrados na figura 9.

Ainda, a citotoxicidade das frações F4 e F5 em células de mamíferos foi analisada e os resultados são mostrados na figura 10. Para tal, macrófagos foram extraídos de camundongos BALB/c e tratados por 24 h a 25°C com as frações F4 e F5. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT.

15 **Exemplo 3 - Purificação da fração F5 obtida a partir do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei***

Após a definição da utilização das frações F4 e F5 para os experimentos citados acima, uma vez que as mesmas haviam apresentado os melhores índices de atividade leishmanicida e não apresentavam citotoxicidade 20 significante para macrófagos de mamíferos, resolvemos eleger a fração F5 para a continuidade dos experimentos pelo fato da mesma se apresentar um rendimento final maior após as purificações.

Desta forma, a purificação em sistema de FPLC da fração F5 foi realizada e novas frações mais puras foram obtidas. Para isso, um pool da 25 fração F5 foi eluído utilizando-se uma coluna MonoQ HR 5/5 de troca iônica

como fase fixa e solução de NaCl como fase móvel. As amostras foram submetidas ao tratamento contra um gradiente de concentração NaCl (0 a 1M), coletadas,dializadas e liofilizadas.

As mesmas foram quantificadas e submetidas a uma eletroforese de 5 proteínas em sistema SDS-PAGE a 10% (figura 11).

As novas frações obtidas a partir da F5 foram testadas quanto a sua atividade leishmanicida sobre formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* e os resultados estão representados na figura 12. Como controle, o fármaco anfotericina B foi utilizado na concentração de 50 µg/mL. O 10 experimento foi realizado pelo protocolo de viabilidade celular empregando-se o reagente MTT e a concentração de 20 µg/mL das frações foi utilizada.

Pode-se verificar uma elevada atividade leishmanicida em algumas das novas frações purificadas por troca iônica, tais como as frações F2, F3, F18, 15 F19 e F27. Tais frações, mesmo em uma concentração menor que a fração F5 anterior, mostraram maior atividade que a mesma. As frações purificadas por troca iônica foram também testadas quanto a toxicidade (Figura 13) e não apresentaram citotoxicidade significativa.

Exemplo 4- Tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados com extrato aquoso e a fração F5 de 20 *Agaricus blazei*

O tratamento de camundongos infectados com *L. amazonensis* foi realizado utilizando para tal o extrato aquoso de *A. blazei* e a fração denominada F5.

Foram testados também 2 tipos de tratamentos: um tratamento 25 profilático (chamado de quimioprofilaxia) e o tratamento convencional. Como os ensaios *in vitro* demonstraram que o extrato aquoso conseguiu diminuir a penetração dos parasitas em macrófagos, um modelo experimental de quimioprofilaxia foi confeccionado para avaliarmos se seria possível, com um pré-tratamento com o extrato aquoso de *A. blazei* ou com a fração F5, reduzir 30 a infecção e impedir ou inibir o desenvolvimento da doença nos camundongos BALB/c.

Para o modelo de quimioprofilaxia, animais foram previamente tratados por 5 dias com o extrato aquoso ou a fração F5 e infectados com 5×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, no coxim plantar direito. Após a infecção, os animais foram tratados por mais 20 dias, com dose 5 única de 2 mg por dia, do extrato aquoso ou da fração F5, via oral por meio de gavagem.

Para os modelos de tratamento convencional, os animais foram infectados com 5×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* no coxim plantar direito e, em seguida, foram tratados por 20 10 dias, com dose única de 2 mg por dia, do extrato aquoso ou da fração F5, via oral por meio de gavagem.

Como controle, foi usado o tratamento pelo mesmo período (20 dias) com 1 mg/Kg/dia do fármaco anfotericina B (deoxicolato) e, como controle da infecção, alguns animais foram infectados e receberam salina por 20 dias.

15 Após a infecção, medições semanais das patas dos animais infectados foram realizadas com o intuito de monitorar a evolução da doença (figura 13). O sacrifício dos animais foi realizado na 10^a semana após a infecção, sendo que alguns órgãos tais como baço, lesão e linfonodo poplíteo, foram coletados e processados para as análises parasitológicas e imunológicas.

20 Na análise da figura 14, pode-se observar uma redução significativa no inchaço nas patas dos animais de ambos os tratamentos propostos (quimioprofilaxia e tratamento convencional) com o extrato aquoso do fungo, quando comparados com o inchaço das patas dos animais infectados e que receberam salina. Observa-se também que a redução do inchaço nas patas 25 dos animais tratados chegou a ser, em algumas medições, menor que a dos animais tratados com anfotericina B.

30 Pode-se observar na análise da figura 15 uma redução significativa no inchaço nas patas dos animais submetidos ao tratamento com a fração F5 quando comparados com o inchaço das patas dos animais que receberam salina (controle da infecção). Tal redução chegou a apresentar valores similares ao observado nas patas infectadas nos animais tratados com anfotericina B. O modelo de quimioprofilaxia não demonstrou redução visível

no inchaço das patas dos animais infectados, quando comparado ao controle de infecção. Entretanto, deve-se destacar que os animais que foram submetidos à quimioprofilaxia não apresentaram toxicidade orgânica, fato que foi verificado nos animais infectados e que foram tratados com anfotericina B, 5 especialmente, aumento significativo nestes animais de enzimas de inflamação hepática.

Na 10^a semana de infecção, os animais foram sacrificados para as análises de quantificação de parasitas, conforme mostrado nas figuras 16 e 17.

Conforme pode ser observado na figura 15, o tratamento convencional e 10 a quimioprofilaxia com o extrato aquoso foram capazes de reduzir de maneira significativa o número de parasitas nos órgãos avaliados (baço, linfonodo poplíteo e pata infectada) dos animais infectados; sendo que tais reduções foram maiores em relação aos valores encontrados nos animais tratados com a anfotericina B.

15 Apesar do modelo de quimioprofilaxia ter apresentado bons resultados quando comparado com o controle de infecção (animais tratados com salina), os melhores resultados foram obtidos com o tratamento convencional, sendo que, neste caso, não foram detectados parasitas no baço destes animais e apenas um pequeno número de parasitas nos linfonodos drenantes e nas patas 20 infectadas, demonstrando a expressiva proteção oferecida pelo tratamento com o extrato aquoso de *A. blazei*.

Apesar do inchaço das patas dos animais infectados e submetidos à quimioprofilaxia com a fração F5 não ter apresentado valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle, observou-se uma redução significativa 25 no número de parasitas nos animais submetidos à quimioprofilaxia quando comparados ao controle de infecção (figura 16). Observou-se também uma redução significante no número de parasitas nos animais infectados e tratados com a fração F5, sendo que também não foi possível detectar parasitas no baço desses animais. Dessa forma, tanto a quimioprofilaxia quanto o 30 tratamento convencional com a fração F5 mostraram reduções significativas no número de parasitas nos diferentes órgãos avaliados, sendo que tais reduções

foram maiores até em relação aos valores observados nos animais tratados com a anfotericina B.

Desta forma e de maneira conclusiva, demonstramos que o extrato aquoso do fungo *A. blazei* e a fração denominada F5 apresentaram importante 5 atividade leishmanicida *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.

Cabe ressaltar que tais estudos foram realizados por duas vezes e os resultados foram similares. Atualmente, experimentos em camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi* estão em andamento utilizando o extrato aquoso e a fração F5 e os resultados mostram-se promissores, tanto na 10 quimioprofilaxia quanto no tratamento convencional dos animais infectados.

REIVINDICAÇÕES

1. **FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA**, caracterizada por compreender o extrato aquoso do cogumelo *Agaricus blazei* e/ou suas frações purificadas denomiandas F4 e F5, com correspondentes protéicos de 50 a 80 kDa, assim como componentes não-protéciso presentes em tais produtos, como taninos, saponinas e polissacarídeos, além de ao menos um excipiente farmacologicamente aceitável em formas farmacêuticas líquidas, semi-líquidas ou sólidas.
- 10 2. **FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser veiculada preferencialmente em formas farmacêuticas selecionadas do grupo compreendendo gel, creme, pomada, pastas, emulsões em geral, soluções, comprimidos e cápsulas.
- 15 3. **FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada por ser administrada pelas vias oral e/ou tópica.
4. **USO DA FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA**, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado por ser para preparação de medicamentos para prevenir a infecção ou tratar mamíferos infectados com *Leishmania*.
- 20 5. **USO DA FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA**, de acordo com as reivindicações 1 a 4 caracterizado por ser aplicado na prevenção ou no tratamento clínico de cães e do homem contra as Leishmanioses.

Figuras

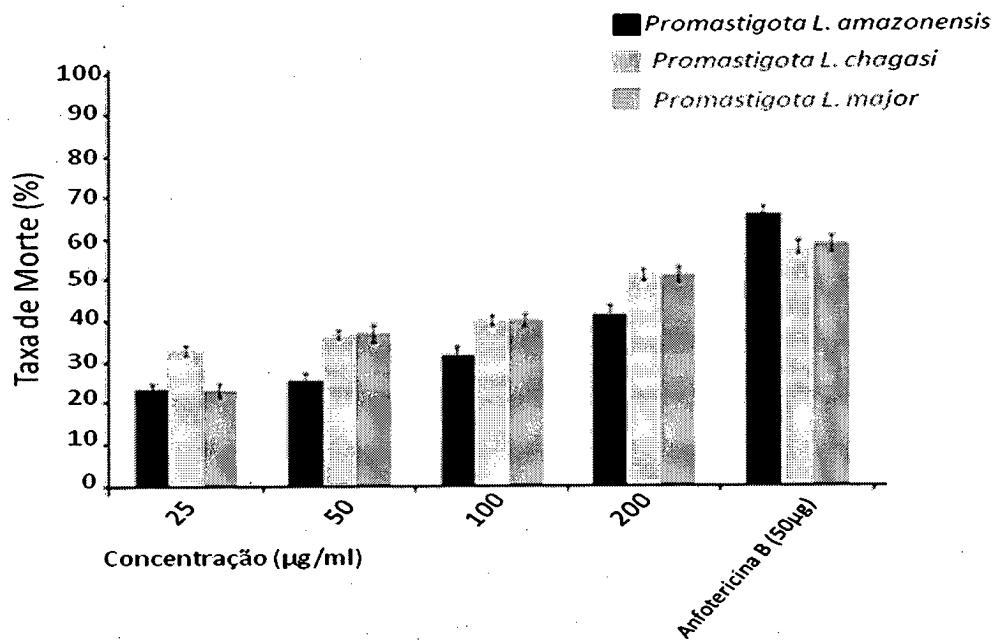


Figura 1

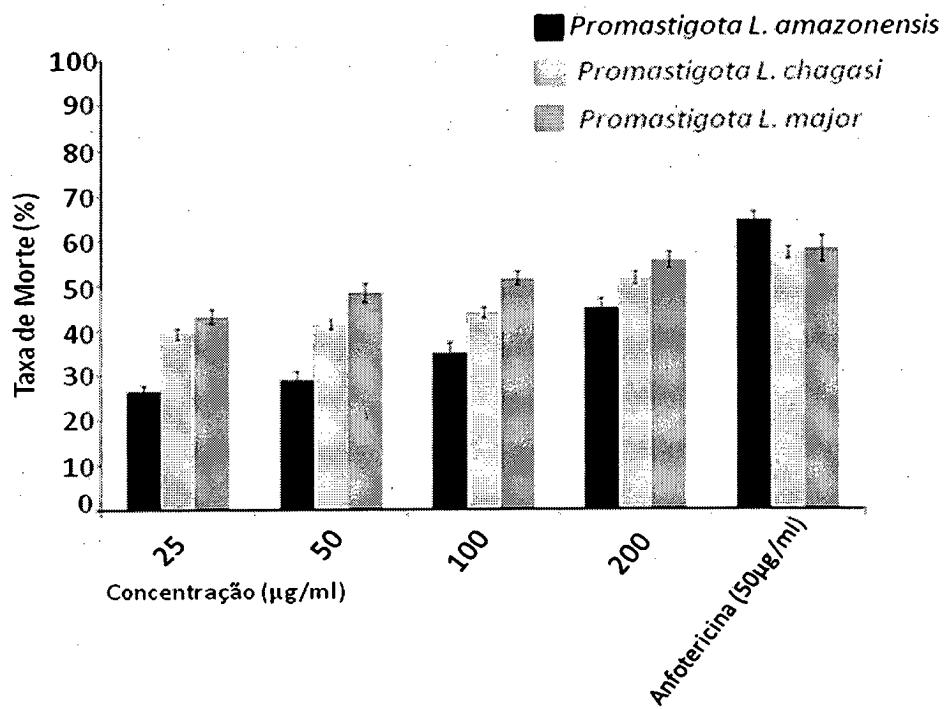


Figura 2

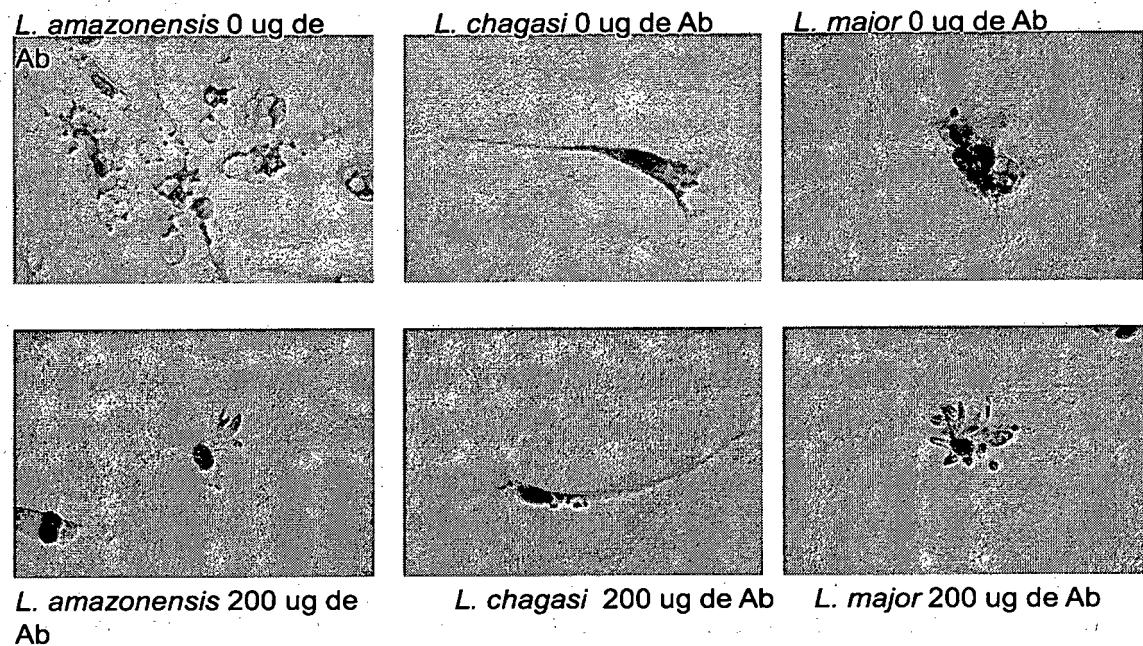


Figura 3

5

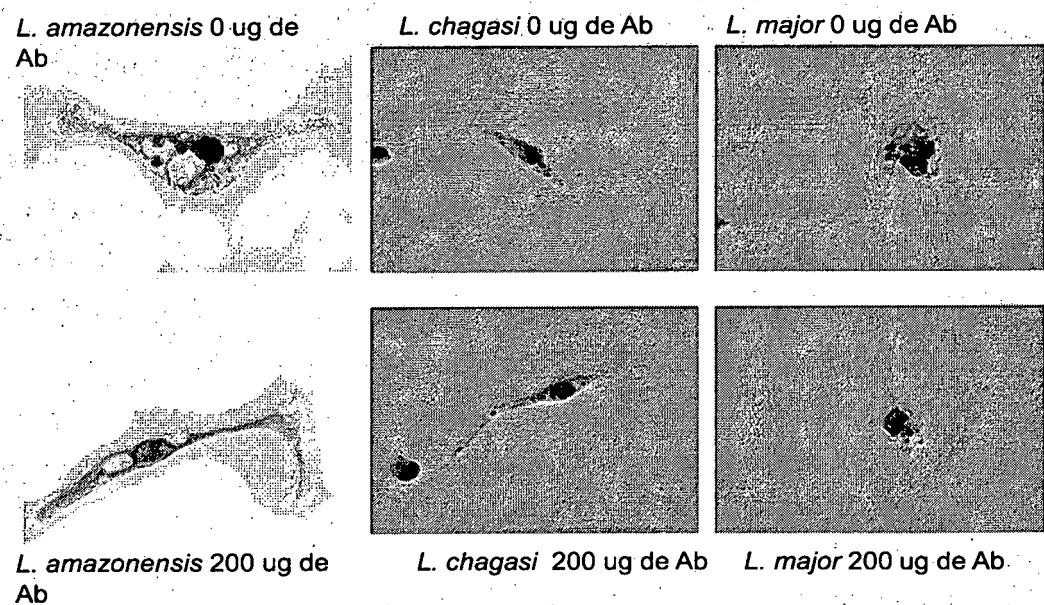


Figura 4

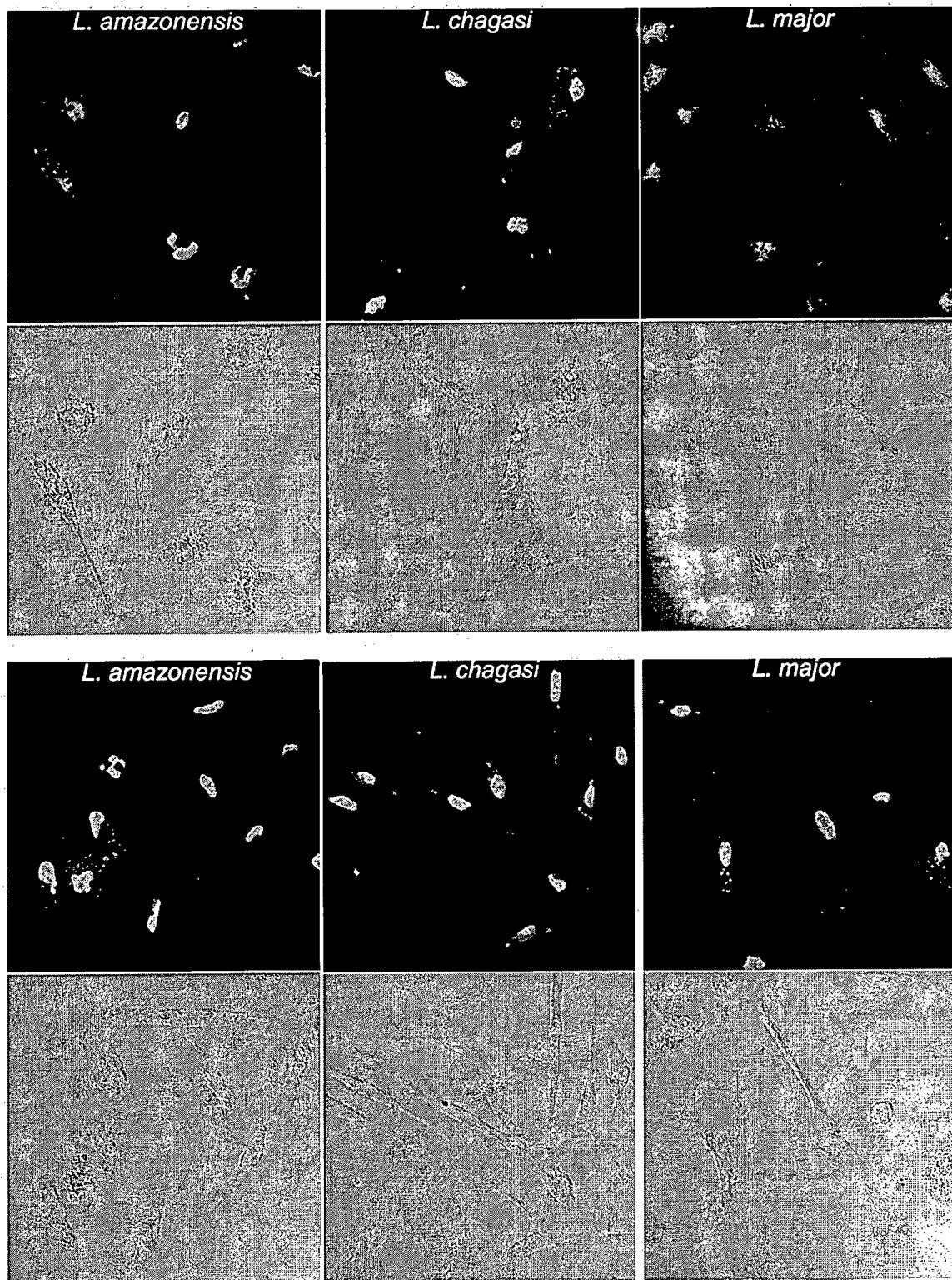
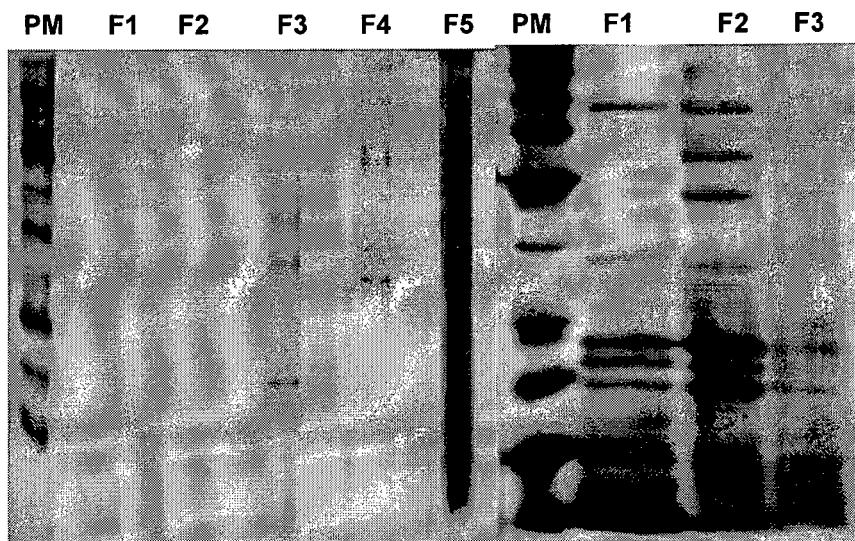


Figura 5



5

Figura 6

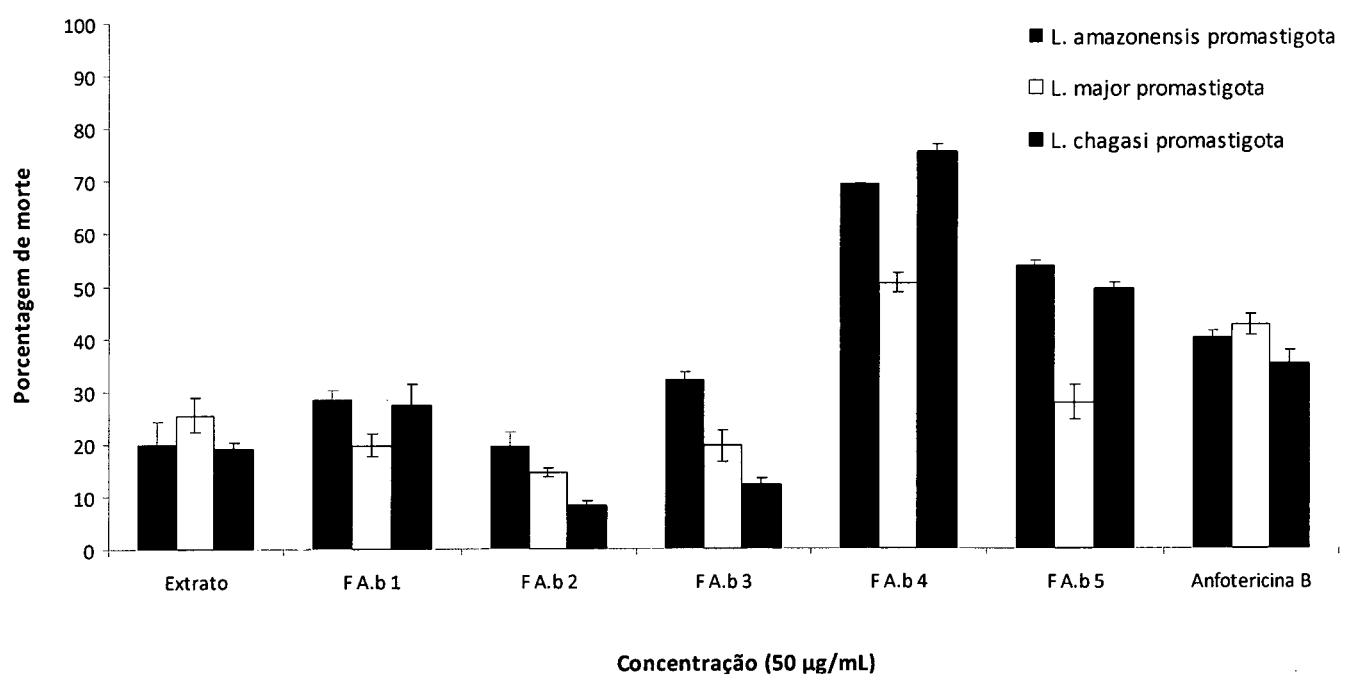


Figura 7

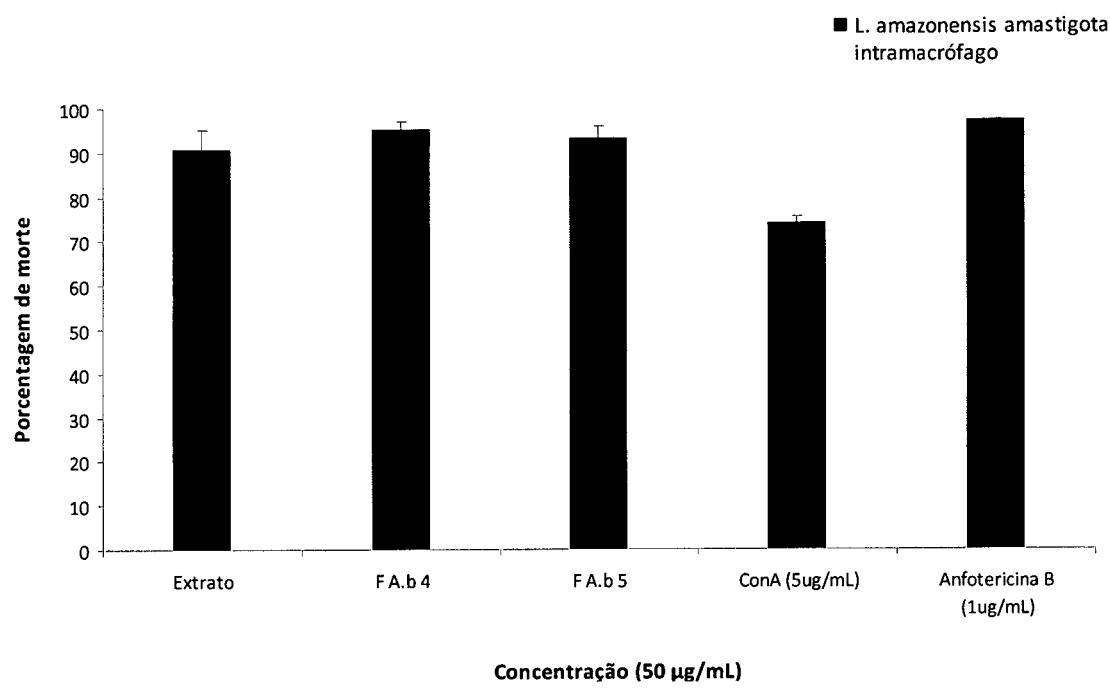


Figura 8

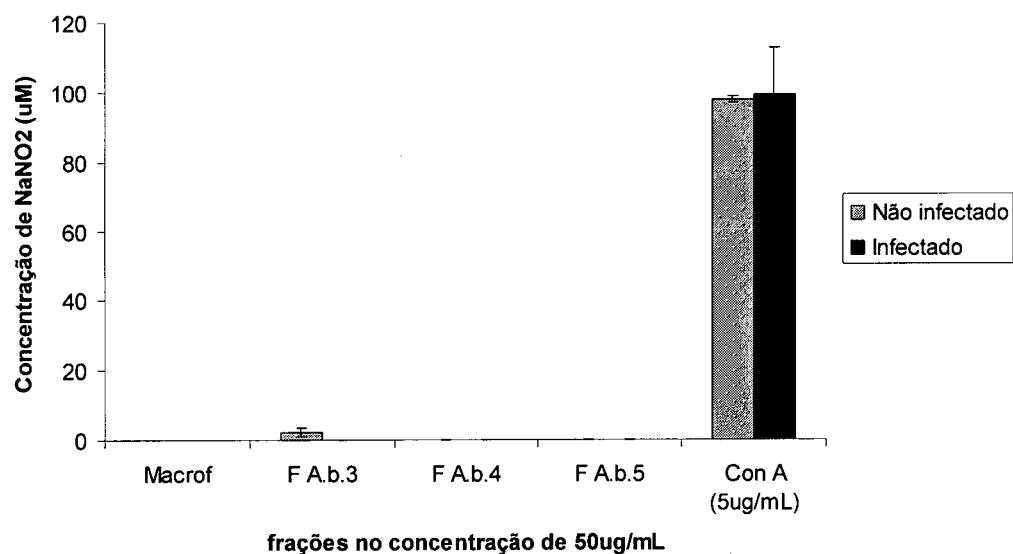


Figura 9

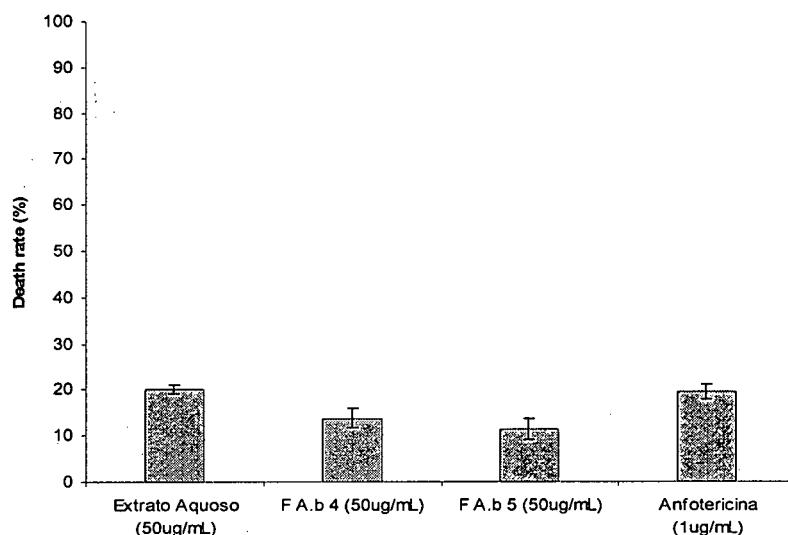


Figura 10

5

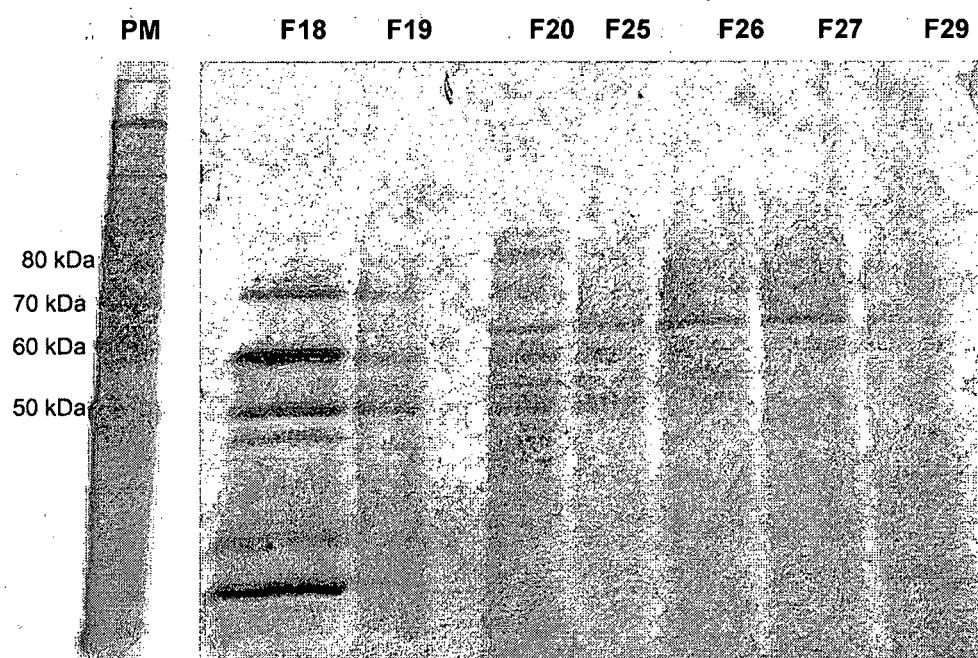


Figura 11

10

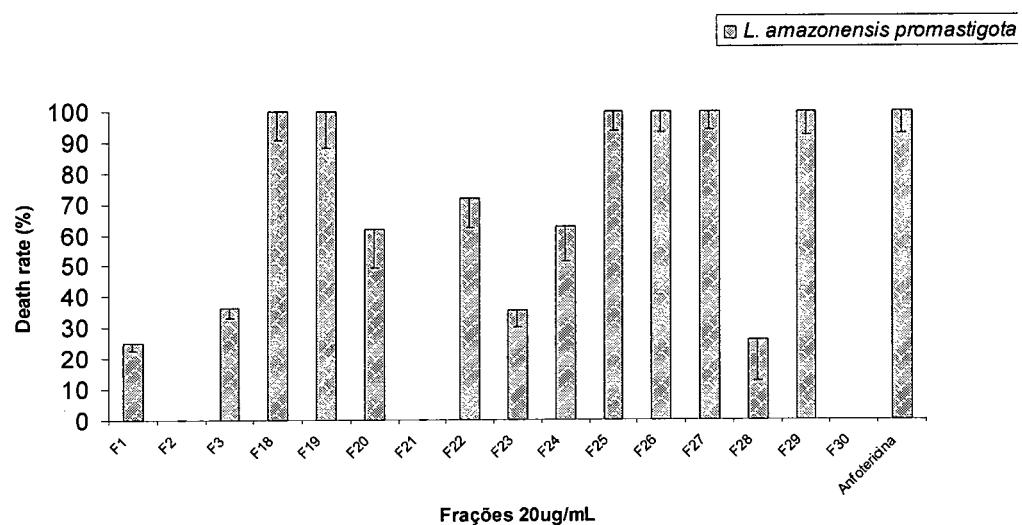


Figura 12

5

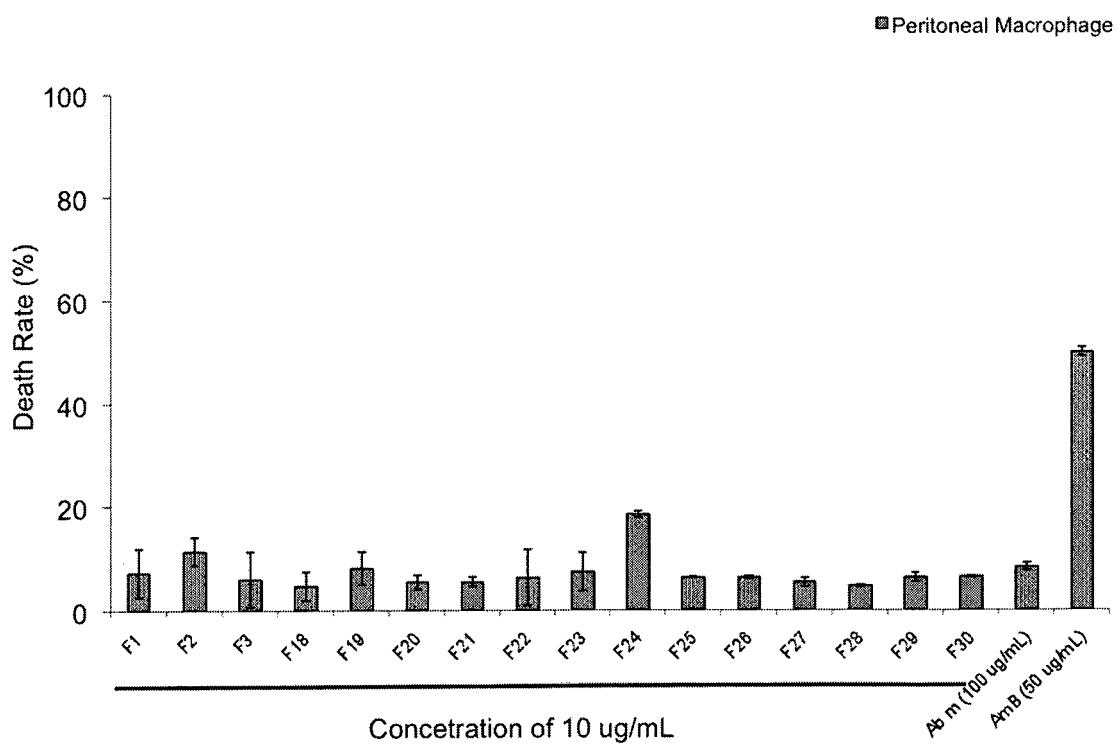


Figura 13

8/9

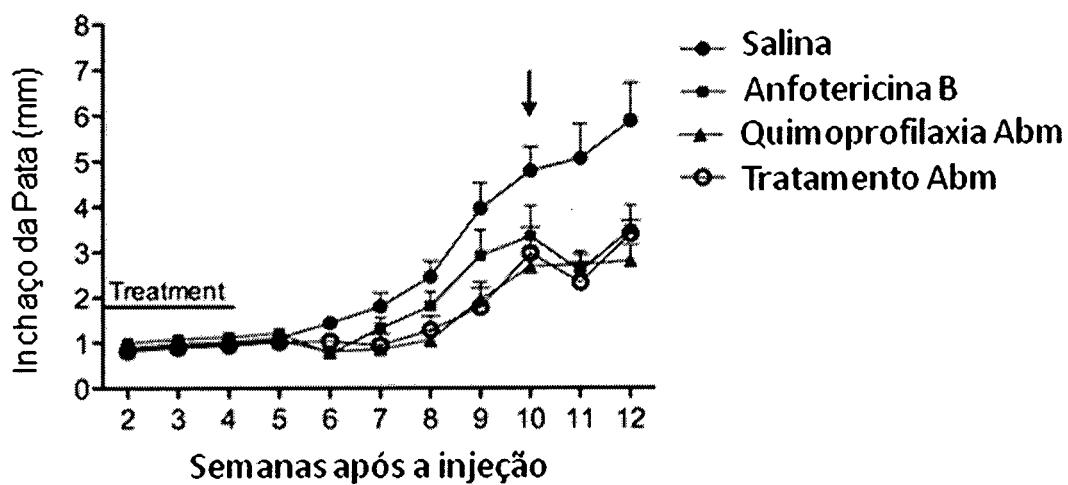


Figura 14

5

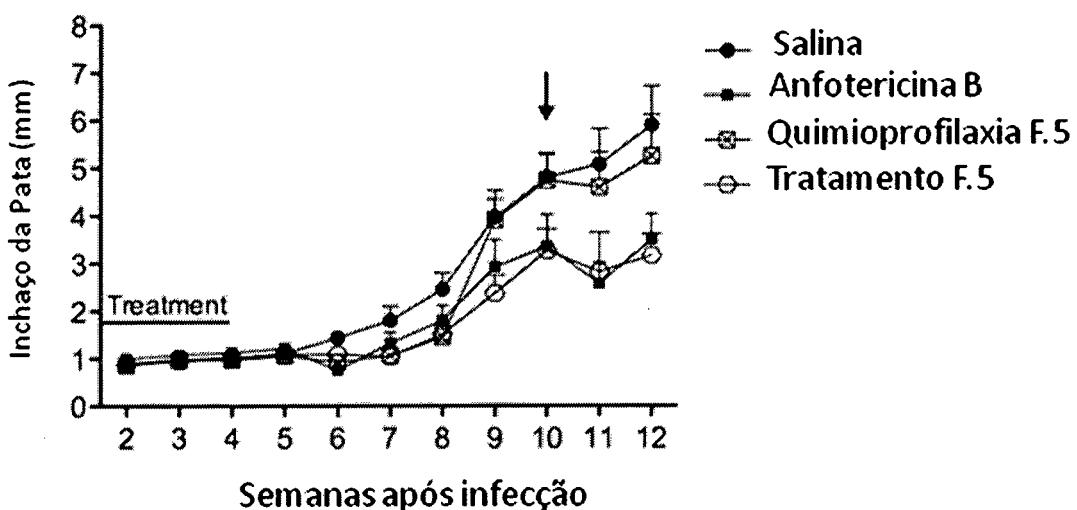


Figura 15

10

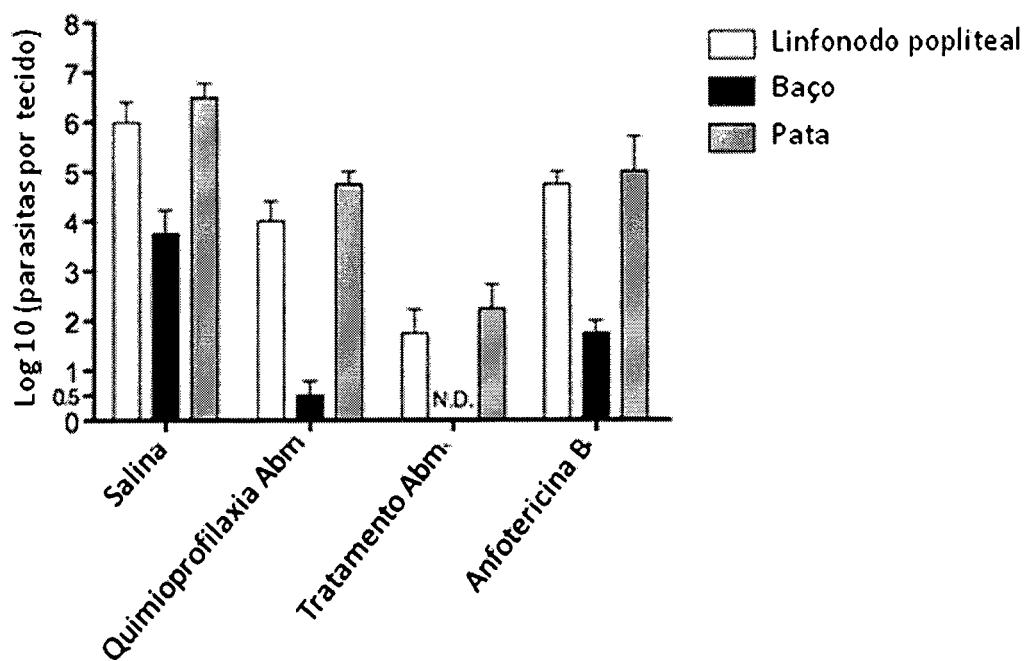


Figura 16

5

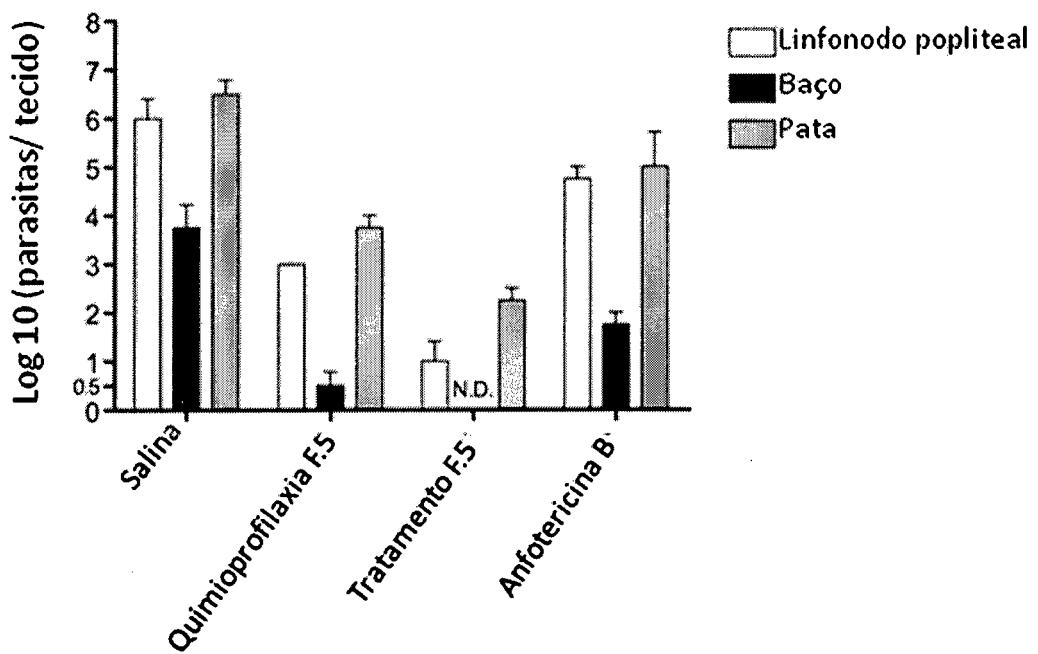


Figura 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2011/000147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K36/07 (2006.01), A61P33/02 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, MEDLINE, WPI DATA, BIOSIS Previews, Chemical Abstracts, PASCAL Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 9920258 A1 (CRAVER WILLIAM E III [US]) 29 April 1999 (1999-04-29) See the whole document	1 a 4
Y	WO 2005065063 A2 (HETLAND GEIR [NO]) 21 July 2005 (2005-07-21) See the whole document	1 a 4
Y	WO 2008039169 A2 (HIROMOTO BRYAN [US]) 03 April 2008 (2008-04-03) See the whole document	1 a 4
A	JP 1228480 A (NIPPON HYPOX LAB INC) 12 September 1989 (1989-09-12)	

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 July 2011

Date of mailing of the international search report

26 September 2011

Name and mailing address of the ISA/

INSTITUTO NACIONAL DA

PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Facsimile No. Rua Mayrink Veiga nº 9, 18º andar
cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Authorized officer

Wellington Inácio de Almeida

+55 21 3039-3493/3742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2011/000147

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No. .
A	JP 11263732 A (ICHIMARU PHARCOS INC) 28 September 1999 (1999-09-28)	
A	JP 11279204 A (SUMITOMO FORESTRY) 12 october 1999 (1999-10-12)	
A	JP 2000032946 A (PAWAFURU KENKO SHOKUHIN KK) 02 February 2000 (2000-02-02)	
Y	ROSA, L.H. et al. 'Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and leishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil'. <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> , 2009, vol. 95, página 227-237. See the whole document	1 a 4
A	ROSA, L.H. & CAPELARI, M. 'Agaricales fungi from Atlantic rain forest fragments in Minas Gerais, Brazil' <i>Brazilian J. Microbiol.</i> 2009, vol. 40, pages 846-851.	
A	SILVA, F.S. et al. 'In vitro pharmacological screening of macrofungi extracts from the Brazilian northeastern region' <i>Pharmaceutical Biology</i> 2009, vol. 47, 5, pages 384-389	
A	BADALYAN, S.M. 'Antiprotozoal activity and mitogenic effect of mycelium of culinary-medicinal shiitake mushroom <i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Singer (Agaricomycetidae)'. <i>International Journal of Medicinal Mushroom</i> 2004, vol. 6, pages 131-138.	
A	INCHAUSTI, A. et al. 'Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from Basidiomycetes'. <i>Phytotherapy Research</i> , 1997, vol. 11, pages 193-197	
A	YUEXIN, L. et al. 'Fractionation and characterization of water-soluble polysaccharides from culinary-medicinal mushroom, <i>Agaricus blazei</i> Murrill (Agaricomycetidae)'. <i>International Journal of Medicinal Mushrooms</i> , 2002, vol. 4, pages 313-319.	
P, X	VALADARES, D.G. et al. 'Leishmanicidal activity of the Agaricus blazei Murill in different Leishmania species' <i>Parasitology International</i> (in press). Available online 24 June 2011 doi:10.1016/j.parint.2011.06.001 See the whole document	1 a 4
P, X	VALADARES, DG. et al.'Leishmanicidal activity of <i>Agaricus blazei</i> fungus against different leishmania species'. Resumo PI026.. Imuno 2010 - XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology. Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brazil. 03 a 06 de novembro de 2010 See the whole document	1 a 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2011/000147

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **5**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy: PCT Article 17(2)(a)(i), PCT Rules 39.1(iv), 67.1(iv). However, since said method involves the administration to a human or animal patient, of a formulation obtained from an extract, the latter was used as the basis for the search of prior art documents.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2011/000147

WO 9920258 A1	1999-04-29	AU 1105199 A	1999-05-10
		CA 2308588 A1	1999-04-29
		EP 1024796 A1	2000-08-09
		US 5906825 A	1999-05-25
WO 2005065063 A2	2005-07-21	CN 1953759 A	2007-04-25
		EP 1708673 A2	2006-10-11
		JP 2007517867 A	2007-07-05
		NO 20044581 D0	2004-10-25
		RU 2006129301 A	2008-02-20
		US 2008233144 A1	2008-09-25
		WO 2005065063 A3	2005-11-17
WO 2008039169 A2	2008-04-03	CA 2618096 A1	2007-02-01
		CN 101389764 A	2009-03-18
		EP 1931360 A2	2008-06-18
		JP 2009513579 A	2009-04-02
		RU 2008108023 A	2009-09-10
		US 2011136758 A1	2011-06-09
		WO 2008039169 A3	2008-11-13
		ZA 200801558 A	2009-10-28
JP 1228480 A	1989-09-12	EP 0413053 A1	1991-02-20
JP 11263732 A	1999-09-28	NONE	
JP 11279204 A	1999-10-12	NONE	
JP 2000032946 A	2000-02-02	NONE	

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2011/000147

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

A61K36/07 (2006.01), A61P33/02 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

A61K, A61P

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC, MEDLINE, WPI DATA, BIOSIS Previews, Chemical Abstracts, PASCAL Database

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
Y	WO 9920258 A1 (CRAVER WILLIAM E III [US]) 29 abril 1999 (1999-04-29) ver todo documento	1 a 4
Y	WO 2005065063 A2 (HETLAND GEIR [NO]) 21 julho 2005 (2005-07-21) ver todo documento	1 a 4
Y	WO 2008039169 A2 (HIROMOTO BRYAN [US]) 03 abril 2008 (2008-04-03) ver todo documento	1 a 4
A	JP 1228480 A (NIPPON HYPOX LAB INC) 12 setembro 1989 (1989-09-12)	

 Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

“A” documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

“E” pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

“L” documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

“O” documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

“P” documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

“T” documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

“X” documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

“Y” documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado comum outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

“&” documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

11 julho 2011

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

260911

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua Mayrink Veiga nº 9, 18º andar
cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ
+55 21 3039-3663

Nº de fax:

Funcionário autorizado

Wellington Inácio de Almeida

Nº de telefone: +55 21 3039-3493/3742

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2011/000147

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
A	JP 11263732 A (ICHIMARU PHARCOS INC) 28 setembro 1999 (1999-09-28)	
A	JP 11279204 A (SUMITOMO FORESTRY) 12 outubro 1999 (1999-10-12)	
A	JP 2000032946 A (PAWAFURU KENKO SHOKUHIN KK) 02 fevereiro 2000 (2000-02-02)	
Y	ROSA, L.H. et al. 'Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and leishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil'. <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> , 2009, vol. 95, página 227-237. ver todo documento	1 a 4
A	ROSA, L.H. & CAPELARI, M. 'Agaricales fungi from Atlantic rain forest fragments in Minas Gerais, Brazil' <i>Brazilian J. Microbiol.</i> 2009, vol. 40, páginas 846-851.	
A	SILVA, F.S. et al. 'In vitro pharmacological screening of macrofungi extracts from the Brazilian northeastern region' <i>Pharmaceutical Biology</i> 2009, vol. 47, 5, páginas 384-389	
A	BADALYAN, S.M. 'Antiprotozoal activity and mitogenic effect of mycelium of culinary-medicinal shiitake mushroom <i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Singer (Agaricomycetidae)'. <i>International Journal of Medicinal Mushroom</i> 2004, vol. 6, páginas 131-138.	
A	INCHAUSTI, A. et al. 'Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from Basidiomycetes'. <i>Phytotherapy Research</i> , 1997, vol. 11, páginas 193-197	
A	YUEXIN, L. et al. 'Fractionation and characterization of water-soluble polysaccharides from culinary-medicinal mushroom, <i>Agaricus blazei</i> Murrill (Agaricomycetidae)'. <i>International Journal of Medicinal Mushrooms</i> , 2002, vol. 4, páginas 313-319.	
P, X	VALADARES, D.G. et al. 'Leishmanicidal activity of the <i>Agaricus blazei</i> Murill in different Leishmania species' <i>Parasitology International</i> (in press). Available online 24 June 2011 doi:10.1016/j.parint.2011.06.001 ver todo documento	1 a 4
P, X	VALADARES, DG. et al.'Leishmanicidal activity of <i>Agaricus blazei</i> fungus against different leishmania species'. Resumo PI026., Imuno 2010 - XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology. Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brazil. 03 a 06 de novembro de 2010 ver todo documento	1 a 4

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional N°

PCT/BR2011/000147

Quadro II Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do ponto 2 da primeira página)

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2.a), pelas seguintes razões:

1. Reivindicações: **5**

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:
aos métodos de tratamento do corpo humano ou animal por cirurgia ou terapia: Art. 17 (2)(a)(i), Regras 39.1 (iv), 67.1 (iv) do PCT. No entanto, já que o referido método está baseado na administração a um paciente humano ou animal uma formulação obtida a partir de extrato, este foi utilizado para efetuar a busca de anterioridades.

2. Reivindicações:

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

3. Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com os parágrafos segundo e terceiro da Regra 6.4.a).

Quadro III Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto 3 da primeira página)

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

1. como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.
2. como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.
3. como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa internacional cobre somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:
4. as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

Observações da reclamação

- as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.
- as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.
- o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2011/000147

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 9920258 A1	1999-04-29	AU 1105199 A CA 2308588 A1 EP 1024796 A1 US 5906825 A	1999-05-10 1999-04-29 2000-08-09 1999-05-25
WO 2005065063 A2	2005-07-21	CN 1953759 A EP 1708673 A2 JP 2007517867 A NO 20044581 D0 RU 2006129301 A US 2008233144 A1 WO 2005065063 A3	2007-04-25 2006-10-11 2007-07-05 2004-10-25 2008-02-20 2008-09-25 2005-11-17
WO 2008039169 A2	2008-04-03	CA 2618096 A1 CN 101389764 A EP 1931360 A2 JP 2009513579 A RU 2008108023 A US 2011136758 A1 WO 2008039169 A3 ZA 200801558 A	2007-02-01 2009-03-18 2008-06-18 2009-04-02 2009-09-10 2011-06-09 2008-11-13 2009-10-28
JP 1228480 A	1989-09-12	EP 0413053 A1	1991-02-20
JP 11263732 A	1999-09-28	Nenhum	
JP 11279204 A	1999-10-12	Nenhum	
JP 2000032946 A	2000-02-02	Nenhum	



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento da Indústria e do Comércio
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) PI 9802526-0 A

(22) Data de Depósito: 23/06/1998

(43) Data de Publicação: 08/02/2000

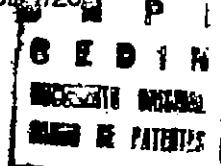
(RPI 1518)

(51) Int. Cl⁵:

A23F 3/34

A61K 35/70

A23L 1/28



(54) Título: CHÁ E EXTRATO OBTIDOS A PARTIR DO COGUMELO AGARICUS BLAZEI MURRIL.

(71) Depositante(s): Marcos Francoti (BR/SP)

(72) Inventor(es): Marcos Francoti

(74) Procurador: Silva & Guimarães Marcas e Patentes Ltda

(57) Resumo: "CHÁ E EXTRATO OBTIDOS A PARTIR DO COGUMELO AGARICUS BLAZEI MURRIL". Referes-e a presente Patente de Invenção a Chá e Extrato Obtidos a Partir da Cogumelo Agaricus Blazei Murril, conhecido como o cogumelo da vida, o qual quando processado na forma de chá são necessárias no mínimo dez gramas e como máximo cinqüenta gramas de cogumelo seco (2) ou uma quantidade entre cem e quatrocentas gramas de cogumelo fresco (1), os quais devem ferver durante sete minutos num litro de água (3), e para a obtenção de extrato são necessárias como mínimo cem gramas e como máximo trezentas gramas de cogumelo seco (5) ou de um a três quilos de cogumelo fresco (4), devendo ferver também por sete minutos num litro de água (3), em ambos casos é necessário deixar esfriar para posterior embalagem, sendo que o chá e o extrato são recomendados, na área alimentar como complemento alimentar, tônico e fortificante e no campo da medicina de forma direta para combater intestino preso e a diminuição das taxas de colesterol e como auxiliar terapêutico no tratamento de câncer e AIDS, diminui o risco de Diabetes e reforça o sistema imunológico dos pacientes e usuários.

“CHÁ E EXTRATO OBTIDOS A PARTIR DO COGUMELO AGARICUS BLAZEI MURRIL”.

Refere-se o presente relatório descritivo de Patente de Invenção a Chá e Extrato Obtidos a Partir de Cogumelo Agaricus Blazei Murril frescos, caracterizado por ser conhecido como o cogumelo da vida, o qual, uma vez processado, seja na forma de chá ou extrato, permite obter uma série de ganhos alimentares e medicinais, dentre os quais podemos destacar os seguintes:

- Serve para combater intestino preso.
- Diminui as taxas de colesterol.
- Auxilia no tratamento do câncer.
- Auxilia no tratamento da AIDS.
- Diminui o risco de Diabetes.
- Reforça o sistema imunológico do organismo.
- Alimento cem por cento natural.

O processamento do cogumelo Agaricus Blazei Murril para obtenção, tanto o chá quanto o extrato, é realizado por meio da fervura num período de tempo pré estabelecido de uma determinada quantidade de cogumelos frescos ou de cogumelos secos numa determinada quantidade de água, esperar esfriar para posterior embalagem num recipiente adequado.

Vale a pena destacar que para a obtenção do chá são necessários, como mínimo cem gramas e como máximo quatrocentas gramas de cogumelos frescos ou uma quantidade variável de dez a cinqüenta gramas de cogumelos secos para um litro de água e para a obtenção do extrato, é necessária a utilização de no mínimo um quilo e três quilos como máximo de cogumelos frescos ou uma quantidade entre cem e trezentas gramas de cogumelo seco para um litro de água.

Para obter uma perfeita visualização das proporções utilizadas para a obtenção, tanto do chá quanto do extrato, acompanham os quadros esquemáticos anexos aos quais se faz referências conforme segue:

Figura 1: Representa quadro esquemático da

P 19802526

composição quantitativa para a obtenção do chá a partir de cogumelos frescos.

Figura 2: Corresponde a quadro esquemático da composição quantitativa para a obtenção do chá a partir de cogumelos secos.

Figura 3:Mostra quadro esquemático da composição quantitativa para a obtenção do extrato a partir de cogumelos frescos.

Figura 4:Ilustra quadro esquemático da composição quantitativa para a composição do extrato a partir de cogumelos secos.

Conforme infere-se dos quadros esquemáticos que acompanham e fazem parte integrante deste relatório, o Cogumelo Agaricus Blazei Murril é vulgarmente conhecido como o Cogumelo da Vida, sendo que o mesmo, quando prescrito como chá ou extrato, apresenta e oferece uma série de ganhos na área alimentar sendo utilizado como complemento alimentar, e na área da medicina, o mesmo é recomendado para tratamento de diversas doenças.

Para o processamento e obtenção, tanto do chá quanto do extrato, o modo operacional é o mesmo, o qual consiste na fervura de uma determinada quantidade de cogumelos frescos ou secos numa determinada quantidade de água por um período de tempo pré estabelecido, sendo que no caso do chá, são necessárias cem gramas como mínimo e trezentas gramas de cogumelo fresco (1) como máximo ou uma quantidade de no mínimo dez gramas e máxima de trinta gramas de cogumelos secos (2) para um litro de água (3), devendo ferver por sete minutos.

Para a obtenção do extrato são utilizados de um a três quilos de cogumelo frescos (4) ou de cem a trezentas gramas de cogumelos secos (5) para cada litro de água (3) e fervido pelo mesmo período de tempo, sendo que em ambos casos o tempo de fervura para obtenção do chá e do extrato é de sete minutos.

Na área alimentar, podemos destacar que o mesmo é recomendado como tônico e fortificante, funcionando como complemento alimentar devido a grande quantidade de vitaminas e sais minerais nele contidas.

Na área médica é recomendado para tratar diversas

P 19602526

5

doenças de forma direta e em outras como auxiliar terapêutico, dentre as quais e como forma direta podemos destacar o combate a intestino preso e a diminuição das taxas de colesterol, como auxiliar terapêutico é utilizado no tratamento de câncer e da AIDS, diminui o risco de Diabetes, bem como reforça o sistema imunológico dos usuários.

As quantidades acima descritas podem sofrer variação quantitativa, de modo a obter chá e extrato mais fortes e concentrados, bem como outros mais suaves.

Percebe-se por todo aquilo que foi descrito e ilustrado que trata-se de Chá e Extrato Obtidos a partir de Cogumelo Agaricus Blazei Murril, o qual dadas suas características naturais, bem como pela quantidade de vitaminas e sais minerais nele contidas, enquadra-se perfeitamente dentro das normas que regem a Patente de Invenção, merecendo por todo aquilo que foi exposto e como consequência, o respectivo privilegio.

REIVINDICAÇÕES

1)"CHÁ E EXTRATO OBTIDOS A PARTIR DO COGUMELO AGARICUS BLAZEI MURRIL", caracterizado por permitir a obtenção de chá a partir da fervura durante sete minutos de uma quantidade mínima de dez gramas e uma máxima de cinqüenta trinta gramas de cogumelo Agaricus Blazei Murril seco (2) ou uma quantidade de cem a quatrocentas gramas de cogumelo fresco (1) em um litro de água(3), pelo período acima descrito, esperar esfriar e posteriormente embalar.

10 2)"CHÁ E EXTRATO OBTIDOS A PARTIR DO COGUMELO AGARICUS BLAZEI MURRIL", caracterizado por permitir a obtenção de extrato a partir da fervura de no mínimo cem gramas e de no máximo trezentas gramas de cogumelos secos (5) ou de um a três quilos de cogumelos frescos (4) em um litro de água (3) durante sete minutos, para ser embalado após seu esfriamento.

15 3)"CHÁ E EXTRATO OBTIDOS A PARTIR DO COGUMELO AGARICUS BLAZEI MURRIL", caracterizado, de acordo com as reivindicações de números um e dois, por ser prescrito na área alimentar como tônico e fortificante, funcionando como complemento alimentar devido a grande quantidade de vitaminas e sais minerais nele contidas, sendo que na área médica é recomendado para tratar diversas doenças de forma direta e outras como auxiliar terapêutico, dentre as quais podemos destacar o combate a intestino preso, a diminuição das taxas de colesterol, como auxiliar no tratamento da AIDS e do câncer, diminui o risco de Diabetes, reforça o sistema imunológico dos pacientes e usuários.

1/2

P19802526

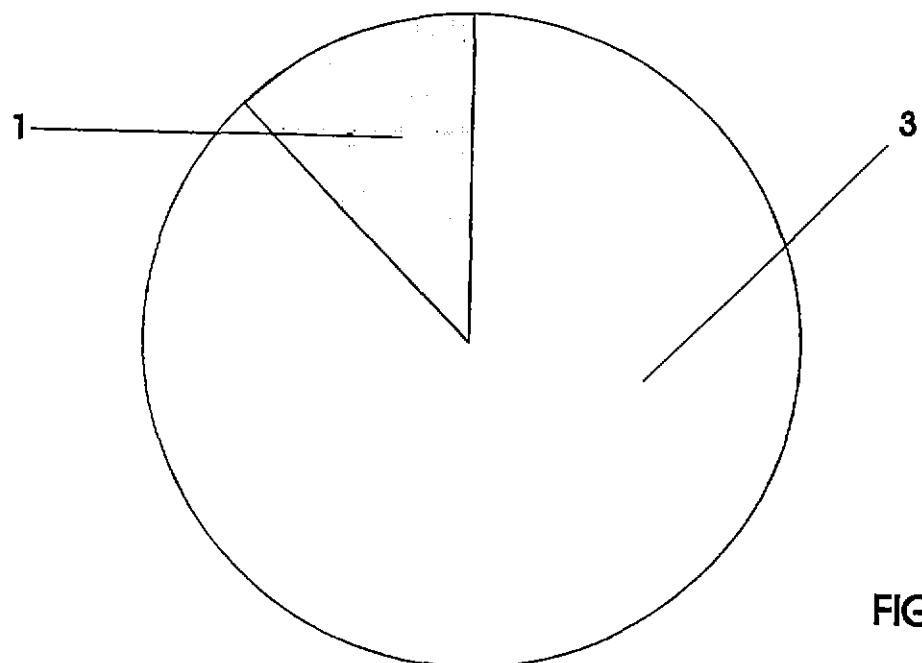


FIG.1

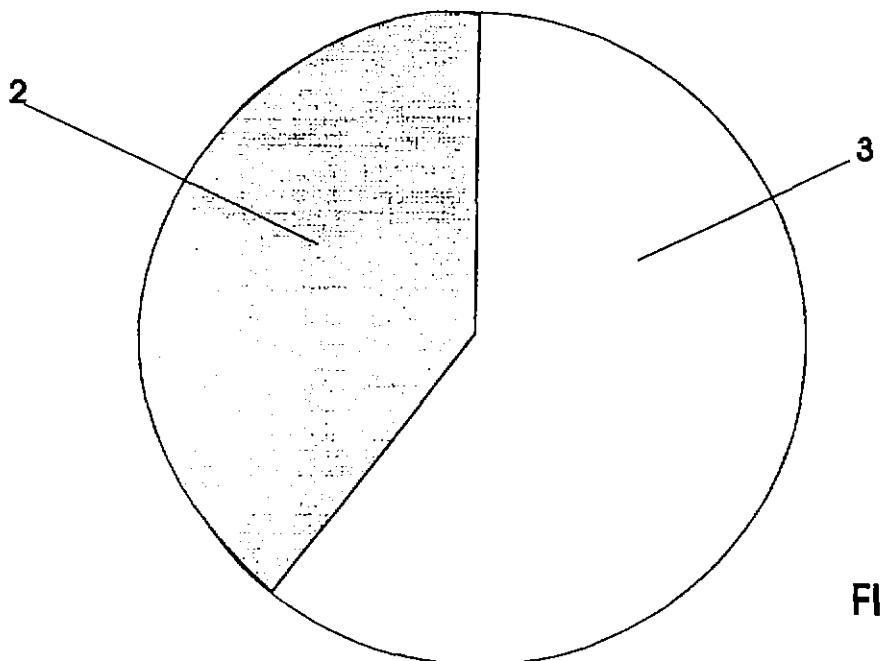


FIG.2

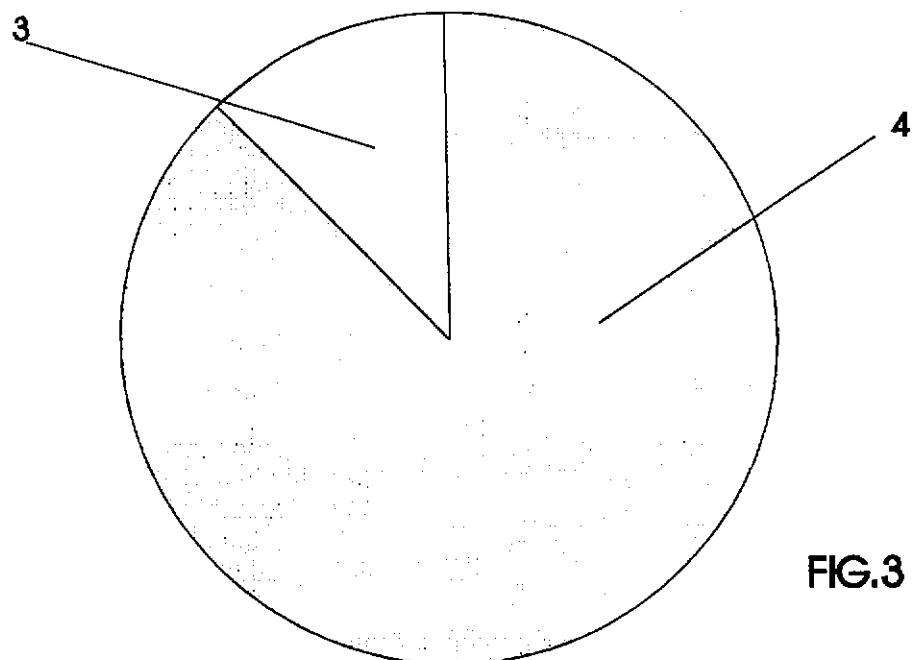


FIG.3

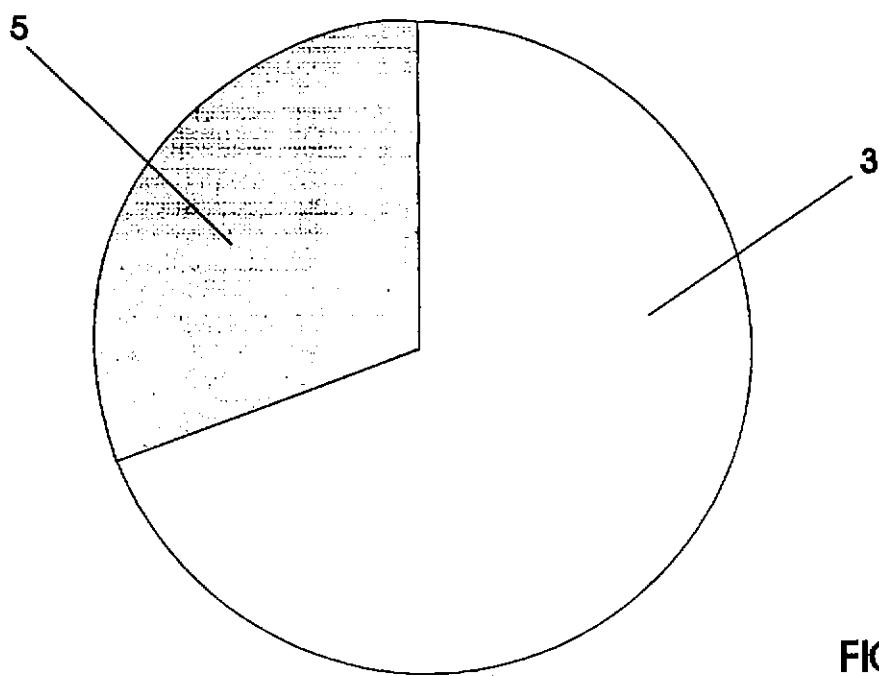


FIG.4

RESUMO

“CHÁ E EXTRATO OBTIDOS A PARTIR DO COGUMELO AGARICUS BLAZEI MURRIL”.

Refere-se a presente Patente de Invenção a Chá e Extrato Obtidos a Partir de Cogumelo Agaricus Blazei Murril, conhecido como o cogumelo da vida, o qual quando processado na forma de chá são necessárias no mínimo dez gramas e como máximo cinqüenta gramas de cogumelo seco (2) ou uma quantidade entre cem e quatrocentas gramas de cogumelo fresco (1), os quais devem ferver durante sete minutos num litro de água (3), e para a obtenção do extrato são necessárias como mínimo cem gramas e como máximo trezentas gramas de cogumelo seco (5) ou de um a três quilos de cogumelo fresco (4), devendo ferver também por sete minutos num litro de água (3), em ambos casos é necessário deixar esfriar para posterior embalagem, sendo que o chá e o extrato são recomendados, na área alimentar como complemento alimentar, tônico e fortificante e no campo da medicina de forma direta para combater intestino preso e a diminuição das taxas de colesterol e como auxiliar terapêutico na tratamento de câncer e AIDS, diminui o risco de Diabetes e reforça o sistema imunológico dos pacientes e usuários.



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

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

BRUNO ALEXANDRE QUADROS GOMES

BELÉM-PA
2011



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

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

BRUNO ALEXANDRE QUADROS GOMES

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

Orientador: Prof. Livre-Docente Sandro Percário.

BELÉM-PA
2011

BRUNO ALEXANDRE QUADROS GOMES

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

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

Banca examinadora:

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

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

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

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

Julgado em: 06/09/2011.

Conceito: _____

DEDICATÓRIA

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

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

AGRADECIMENTOS

A Deus:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Friedrich Nietzsche.

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

Albert Einstein.

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

Figura 11- Punção cardíaca em camundongos <i>Mus musculus</i> para coleta de amostra sanguínea.	64
Figura 12- Inoculação intraperitoneal de hemárias infectadas com o <i>P. berghei</i> ANKA em camundongos <i>Mus musculus</i> .	65
Figura 13- Disruptor celular ultrassônico para homogeneização das amostras de tecido pulmonar e cerebral.	66
Figura 14- Esfregaço sanguíneo de camundongos infectados pelo <i>P. berghei</i> corado pelo método de Giemsa, em microscópio óptico com aumento de 1000x.	67
Figura 15- Progressão da parasitemia nos camundongos infectados com <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes, comparados ao grupo controle positivo de acordo com o tempo de infecção.	70
Figura 16 – Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.	71
Figura 17- Comportamento do malondialdeído (MDA) pulmonar dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.	73
Figura 18- Comportamento do óxido nítrico (NO) pulmonar dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o <i>P. berghei</i> e suplementados com antioxidantes.	75
Figura 19: Correlação entre Malondialdeido (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteina (d) e <i>Agaricus sylvaticus</i> (e).	77
Figura 20- Comportamento de Malondialdeido (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.	79
Figura 21: Correlação entre Malondialdeido (MDA) e óxido Nítrico (NO) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteina (d) e <i>Agaricus sylvaticus</i> (e).	80
Figura 22- Comportamento de Malondialdeido (MDA) e óxido Nítrico (NO) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.	82

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

1- INTRODUÇÃO

1.1 – MALÁRIA

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

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

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

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

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

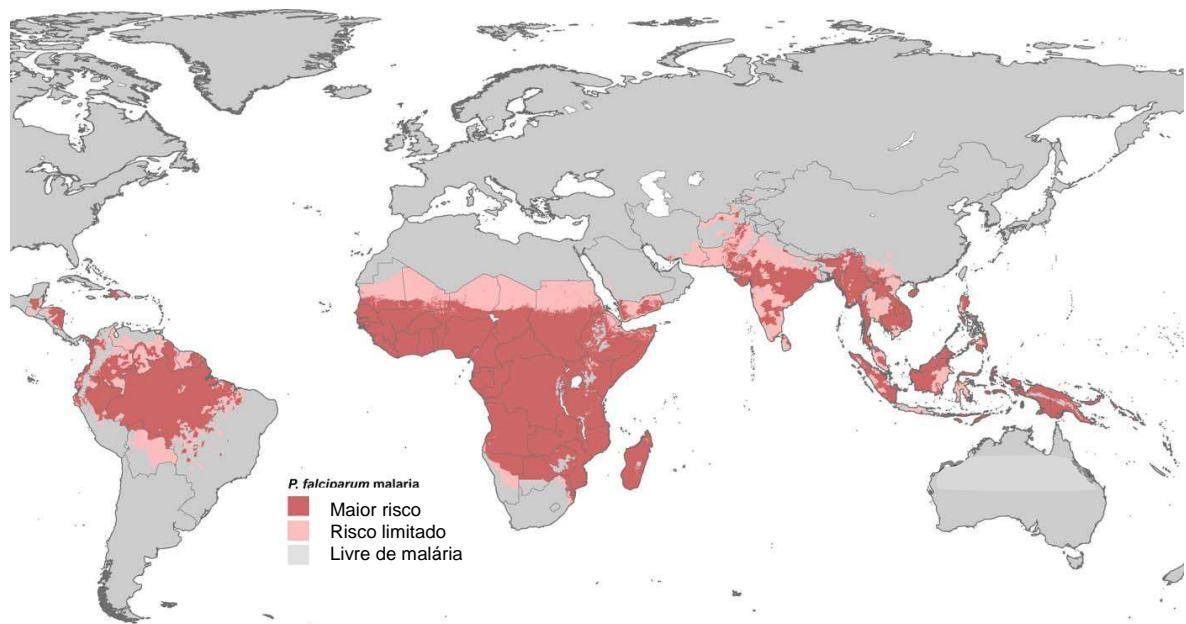


Figura 1: Risco de malária por *P. falciparum* definido pela incidência parasitária anual (IPA; SNOW et al., 2008).

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

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

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

Durante o desenvolvimento intra-eritrocítico do parasita, cerca de 80% das moléculas de hemoglobina são degradadas como fonte de aminoácidos, resultando na liberação de grande quantidade de heme livre (Ferriprotoporfirina IX) e radicais livres (MASHIMA et al., 2002). Por possuir grupos Fe²⁺ associados, estes grupos heme são capazes de induzir o estresse oxidativo intravascular, causando alterações nos eritrócitos e nas células endoteliais, favorecendo a internalização do parasita nos tecidos, como o fígado e o cérebro (JARAMILLO et al., 2005).

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

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

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

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

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

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

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

1.1.1 - Características Biológicas e Ciclo Evolutivo do *Plasmodium*

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

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

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

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

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

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

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

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

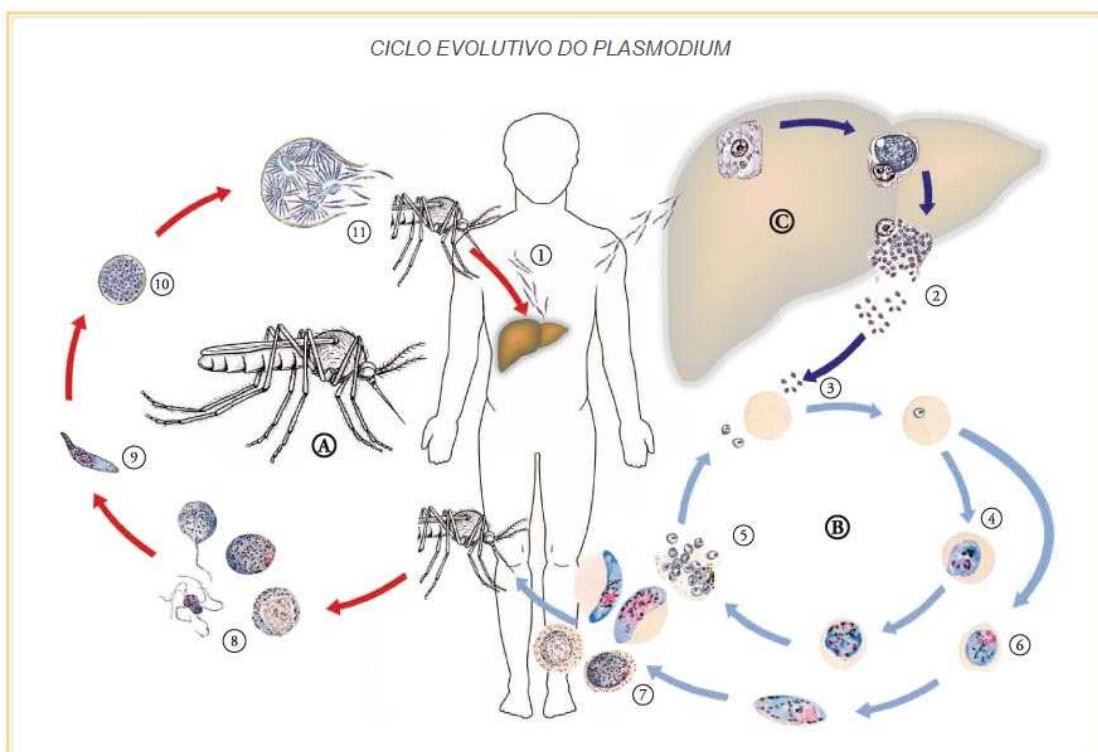


Figura 2: Ciclo evolutivo do *Plasmodium*. A) Ciclo esporogônico; B) Ciclo eritrocítico; C) Ciclo Hepático (B e C – Ciclo esquizogônico). 1) Esporozoito; 2) Merozoítos sanguíneos; 3) Penetração de merozoítos nas hemácias; 4) Esquizonte; 5) Esquizonte maduro; 6) Gametócitos; 7) Gametócitos maduros (microgametócito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

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

1.1.2- Patogênese da Malária

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

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

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

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

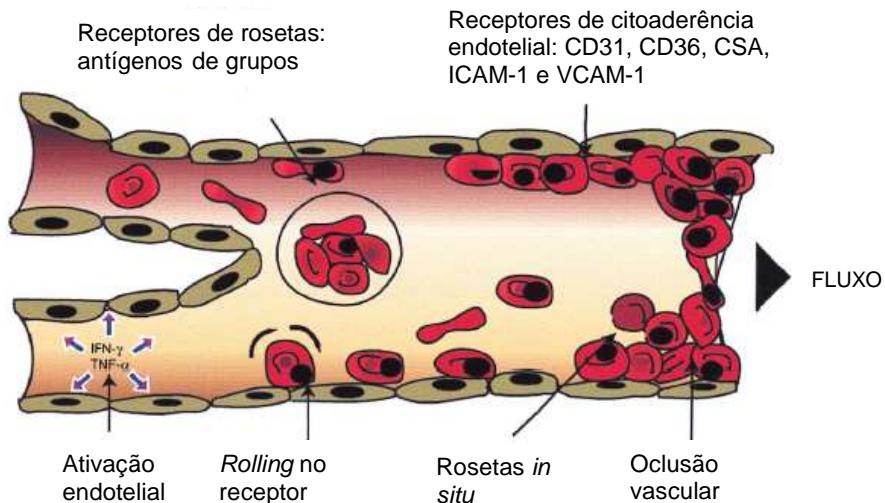


Figura 3: Citoaderência e rosetas no endotélio vascular. As hemácias infectadas se ligam ao endotélio vascular e às hemácias não-infectadas. Ambos os fenômenos contribuem para a oclusão do fluxo sanguíneo e consequente gravidade da doença. Os抗ígenos do parasita podem induzir a liberação de IFN- γ e TNF-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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 – OS RADICAIS LIVRES E O ESTRESSE OXIDATIVO

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

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

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

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

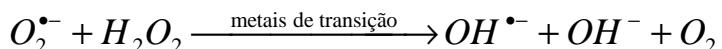


Figura 4: Reação de Haber-Weiss. O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na presença de metais de transição, para produzir radicais hidroxila ($OH^{\bullet-}$), íons hidroxila (OH^-) e oxigênio (O_2).

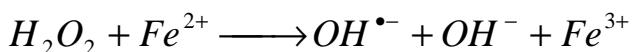


Figura 5: Reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é ionizado na presença de íons ferrosos, levando à produção de radicais hidroxila ($OH^{\bullet-}$) e íons hidroxila (OH^-). O íon ferroso (Fe^{+2}) sofre oxidação sendo liberado na forma de íon férrico (Fe^{+3}).

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

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

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

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

1.2.1 - O Estresse Oxidativo na Malária

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

com a fisiopatologia da doença (SOHAIL *et al.*, 2007). No entanto, recentes estudos sugerem que a geração ROS e o estresse oxidativo associado desempenham um papel crucial no desenvolvimento de complicações sistêmicas da malária. A infecção malárica induz a geração de radical $\cdot\text{OH}$ no fígado, que deve ser o principal responsável pela indução de estresse oxidativo e apoptose (GUHA *et al.*, 2006). Adicionalmente, Atamna *et al.* (1994) observaram que hemácias infectadas com *P. falciparum* produziram radicais H_2O_2 e OH^\cdot cerca de duas vezes mais em relação as hemácias normais.

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

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

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

1.2.2 – Peroxidação Lipídica e Hemólise em Eritróцитos Infectados

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

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

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

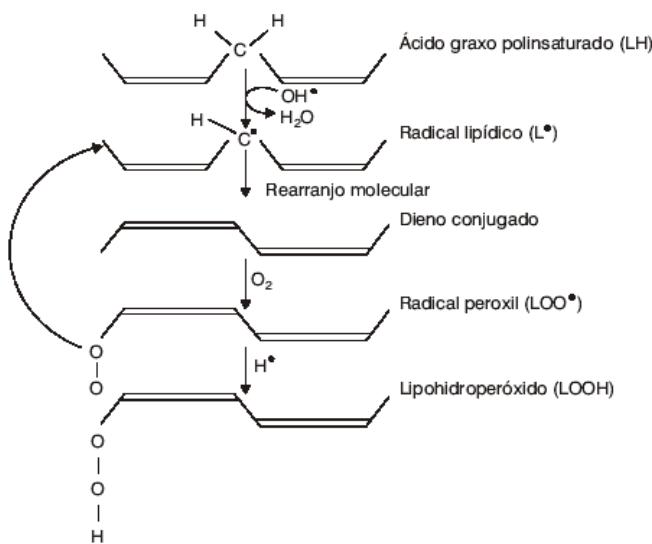


Figura 6: Representação esquemática da peroxidação lipídica dos ácidos graxos da membrana celular. O radical livre OH^\bullet abstrai um hidrogênio do ácido graxo, dando origem ao radical lipídico. Este, por ser instável, sofre um rearranjo molecular e forma um dieno conjugado, o qual pode reagir com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

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

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

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

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

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

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

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

1.3- A DEFESA ANTIOXIDANTE FISIOLÓGICA

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

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

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

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

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

A GSH-Px é uma enzima sequestrante de peróxidos lipídicos dependente de selênio, com concomitante oxidação da glutationa, tendo atividade antioxidante nos eritrócitos (POTTER *et al.*, 2005). A enzima é distribuída tanto em animais como em plantas e exerce um grande espectro de funções biológicas, desenvolvendo um papel antioxidante muito importante na defesa contra as lesões oxidativas das células pela varredura de H₂O₂ intracelular (TRIVEDI *et al.*, 2005).

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

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

A enzima SOD também é importante na defesa antioxidante, pois tem a propriedade de dismutar o radical O₂[•] em H₂O₂ e O₂. Isto pode ocorrer no vacúolo digestivo, que pode ser considerado o maior gerador de ROS, onde a

ferroprotoporfirina IX é oxidada de Fe^{2+} a Fe^{3+} com consequente produção de O_2^\cdot (BECKER *et al.*, 2004). O H_2O_2 , contudo, também precisa ser detoxificado por peroxidases ou catalase porque, na presença de átomos metálicos reduzidos, pode transformar-se em um radical OH^\cdot altamente reativo. A catalase é uma enzima tetramérica que converte eficientemente H_2O_2 em água e oxigênio sem produção de ROS (BOZDECH *et al.*, 2004; De JONG *et al.*, 2007). Por outro lado, a expressão de citocinas induzidas pela hemozoína parece ser dependente da produção de ROS e pode ser inibida pela adição da SOD (PINO *et al.*, 2005). A figura 7 mostra esquematicamente os mecanismos de defesa antioxidante envolvidos na infecção pelo *Plasmodium*.

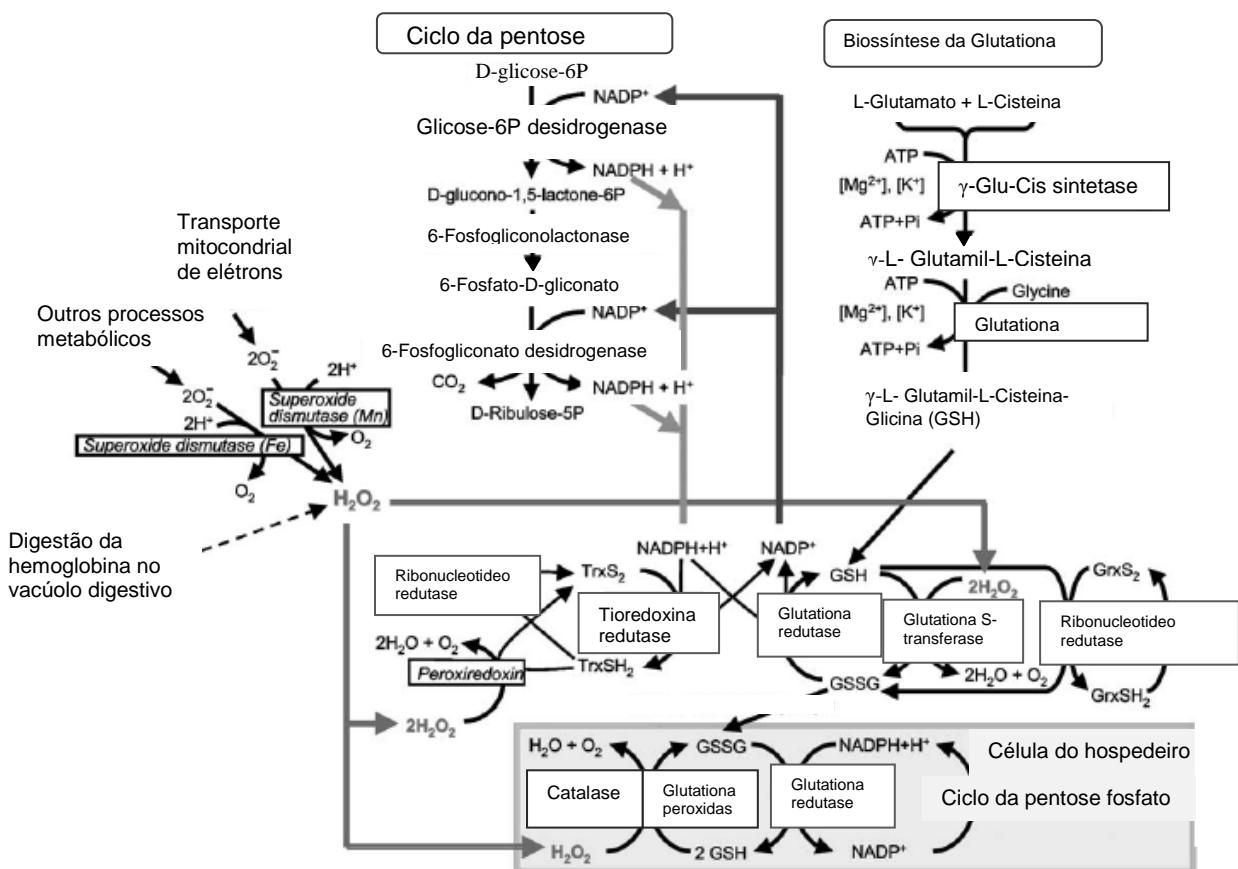


Figura 7: Representação esquemática da defesa antioxidante no eritrócito infectado pelo *plasmodium* (BECKER *et al.*, 2004).

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

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

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

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

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

Tem se demonstrado que o estresse oxidativo está relacionado com um papel protetor em portadores de malária (GUHA *et al.*, 2006). Tanto as ROS quanto as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são sugeridas como possíveis agentes capazes de destruir o *Plasmodium*. Assim, o H₂O₂ e o O₂[•] podem funcionar independentemente como agentes citotóxicos ou formar outras moléculas tóxicas, incluindo o radical OH[•], ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito (ONOO[•]) na presença de óxido nítrico (NO; GILLMAN *et al.*, 2004).

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

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

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

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

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

1.3.3 – A Defesa Antioxidante do *Plasmodium*

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

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

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

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

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

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

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

2– REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - RESPOSTA IMUNE E PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA MALÁRIA

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

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

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

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

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

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

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

2.2– EVIDÊNCIAS DAS ALTERAÇÕES DA DEFESA ANTIOXIDANTE EM PORTADORES DA MALÁRIA

2.2.1- Em Modelos Experimentais da Malária

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

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

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

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

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

2.2.2- Em Pesquisas Clínicas da Malária

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

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

al., 2001), as vitaminas A, E, C; pró-vitaminas α e β caroteno e licopeno (METZGER et al., 2001; CAULFIELD et al., 2004).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3 – ESTUDOS DE INTERVENÇÕES COM ANTIOXIDANTES

2.3.1- Em Modelos Experimentais

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

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

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

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

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

2.3.2 – Em Pesquisas Clínicas

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

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

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

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

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

2.4– POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA N-ACETILCISTEINA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

3- OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

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

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

4- METODOLOGIA

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

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

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

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

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

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

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

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



Figura 9- Acondicionamento dos camundongos *Mus musculus*.



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

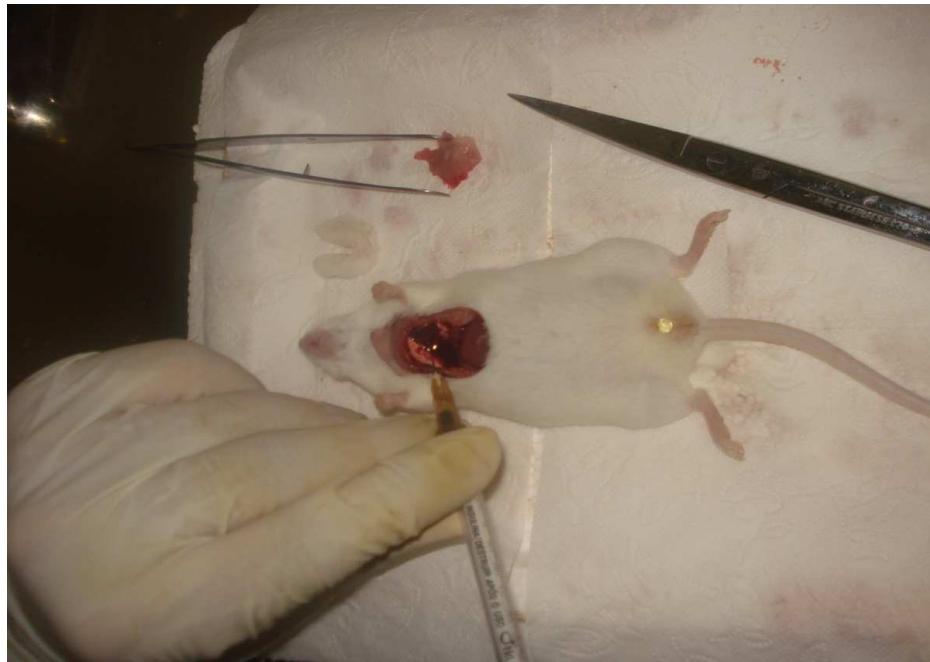


Figura 11- Punção cardíaca em camundongos *Mus musculus* para coleta de amostra sanguínea.

4.1- INDUÇÃO DA MALÁRIA NOS ANIMAIS

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



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

4.2 – HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS

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



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

4.3- DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA

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

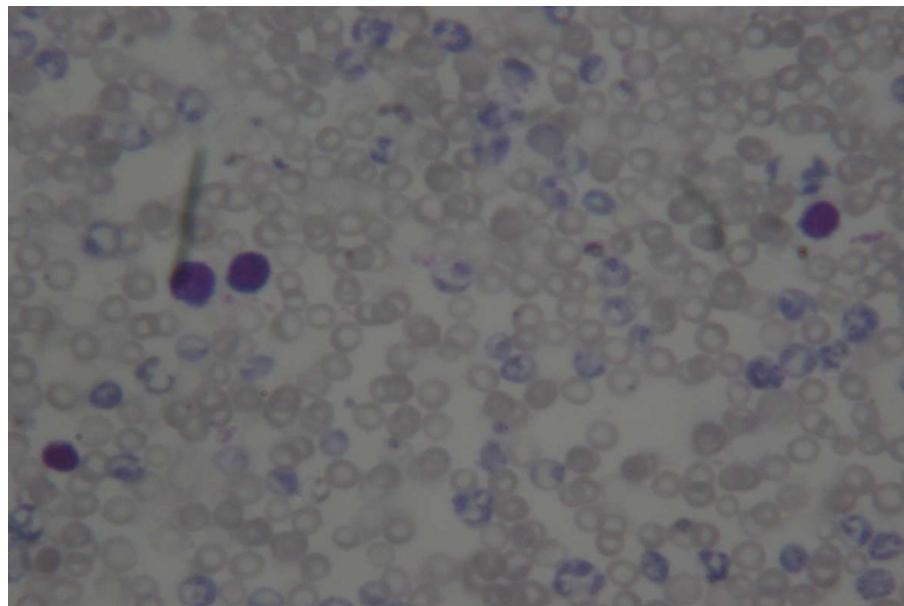


Figura14- Esfregaço sanguíneo de camundongos infectados pelo *P. berghei* corado pelo método de Giemsa, em microscópio óptico com aumento de 1000x.

4.4- PROCEDIMENTO TÉCNICO:

4.4.1- Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TEAC)

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

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

4.4.2- Dosagem do Malondialdeído (MDA)

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

4.4.3- Dosagem do Óxido Nítrico (NO)

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

4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

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

5- RESULTADOS

5.1- PARASITEMIA

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

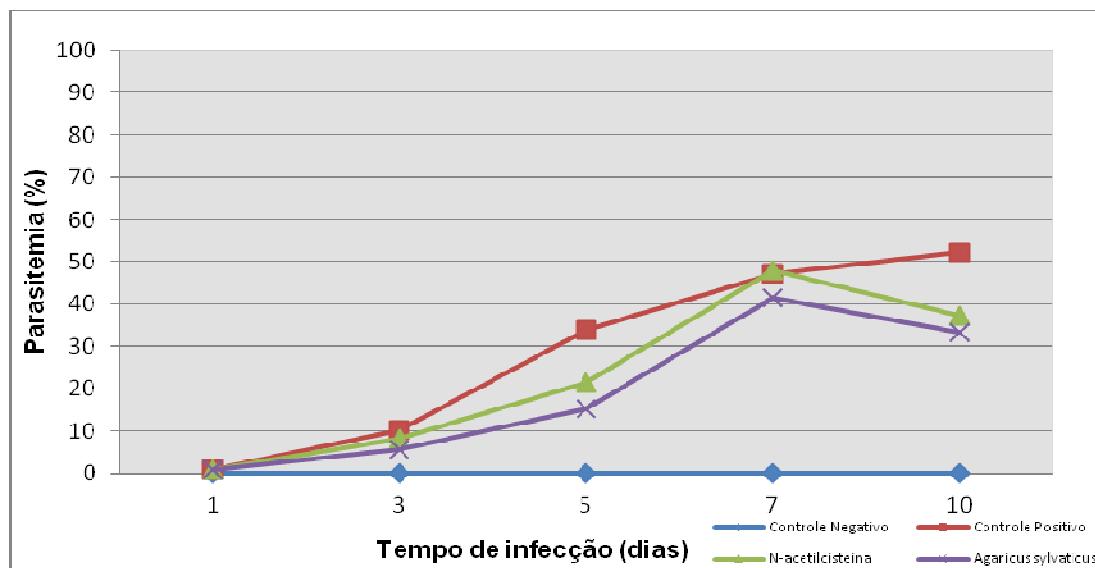


Figura 15- Progressão da parasitemia nos camundongos infectados com *P. berghei* e suplementados com antioxidantes, comparados ao grupo controle positivo, de acordo com o tempo de infecção.

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

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

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

CP: Controle Positivo; NAC: N-acetilcisteína; AS: *Agaricus sylvaticus*. ^{\$} $p<0,05 \times CP$; [#] $p<0,01 \times CP$. Valores expressos como média±desvio padrão. *t Student 10 dias x 1 dia de infecção.

5.2- DOSAGENS PULMONARES

5.2.1- Perfil do TEAC

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

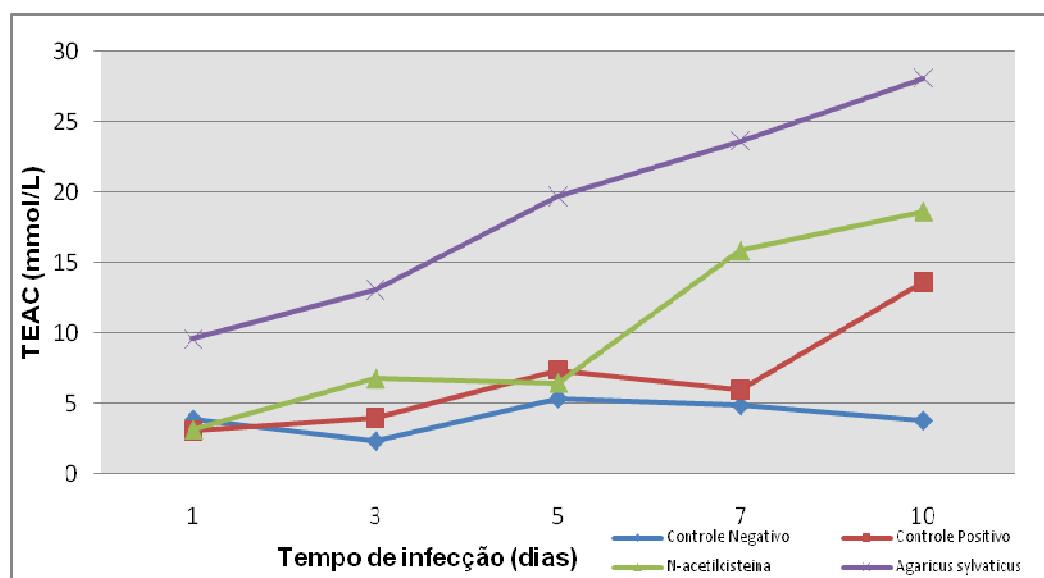


Figura 16 – Comportamento da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar dos animais dos grupos controles e dos grupos infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

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

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

Grupo	TEAC (mmol/L)					<i>p</i> valor*
	1 dia	3 dias	5 dias	7 dias	10 dias	
CP	3,1±0,7 [#]	4,0±0,7 ^{#\$%}	7,4±2,2 [#]	5,9±0,5 ^{#\$}	13,6±4,5 ^{#&}	7,283x10 ⁻⁶
CN	3,9±1,2 [#]	2,4±1,1 ^{#\$}	5,3±1,5 [#]	4,8±0,6 ^{#\$}	3,8±1,9 ^{#\$}	0,8174
NAC	3,1±1,4 [#]	6,8±0,7 [#]	6,5±1,2 [#]	15,8±5,0 [#]	18,6±3,5 [#]	5,401x10 ⁻⁹
AS	9,6±2,3	13,0±1,4	19,7±4,9	23,6±2,3	28,1±5,8	5,523x10 ⁻⁷

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

5.2.2- Perfil do MDA

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

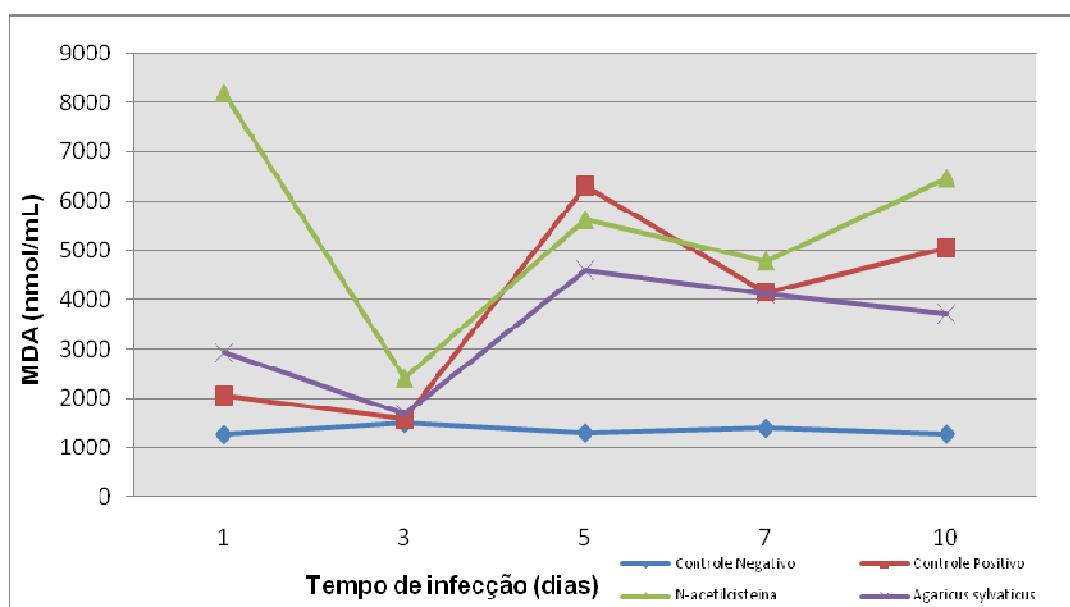


Figura 17- Comportamento do malondialdeido (MDA) pulmonar dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

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

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

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

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

5.2.3- Perfil do NO

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

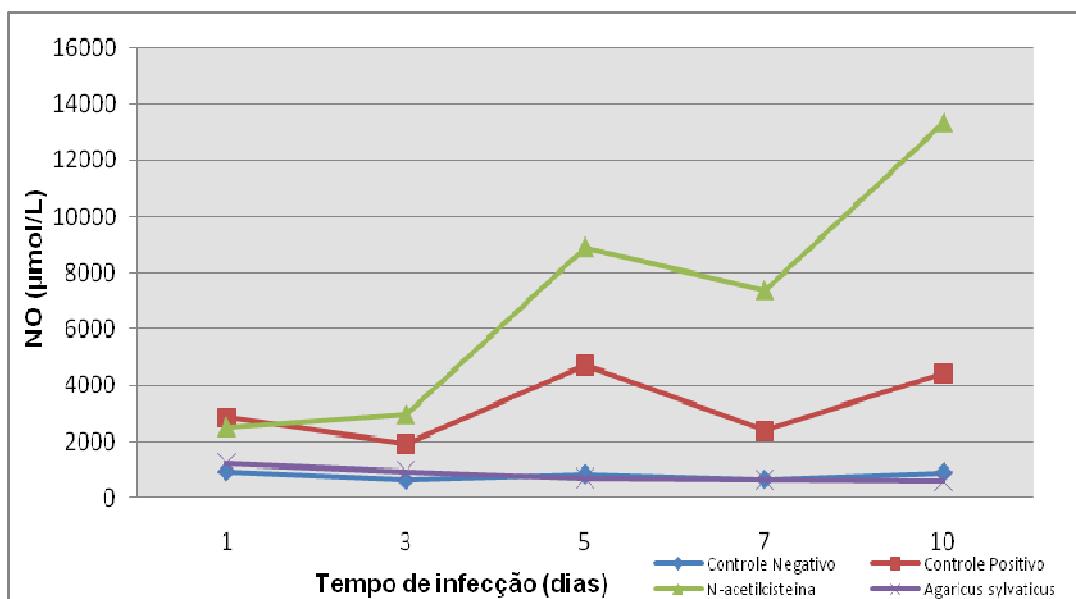


Figura 18- Comportamento do óxido nítrico (NO) pulmonar dos animais dos grupos controles e de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

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

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

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

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; NAC: N-acetilcisteína; AS: *Agaricus sylvaticus*. [#]p<0,01xNAC;
^{\\$}p<0,05xCP. Valores expressos como média±desvio padrão. *t Student 10dias x 1 dia de infecção.

5.2.4- Estudo de Correlação em Amostras Pulmonares

5.2.4.1- Correlação entre MDA e TEAC

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

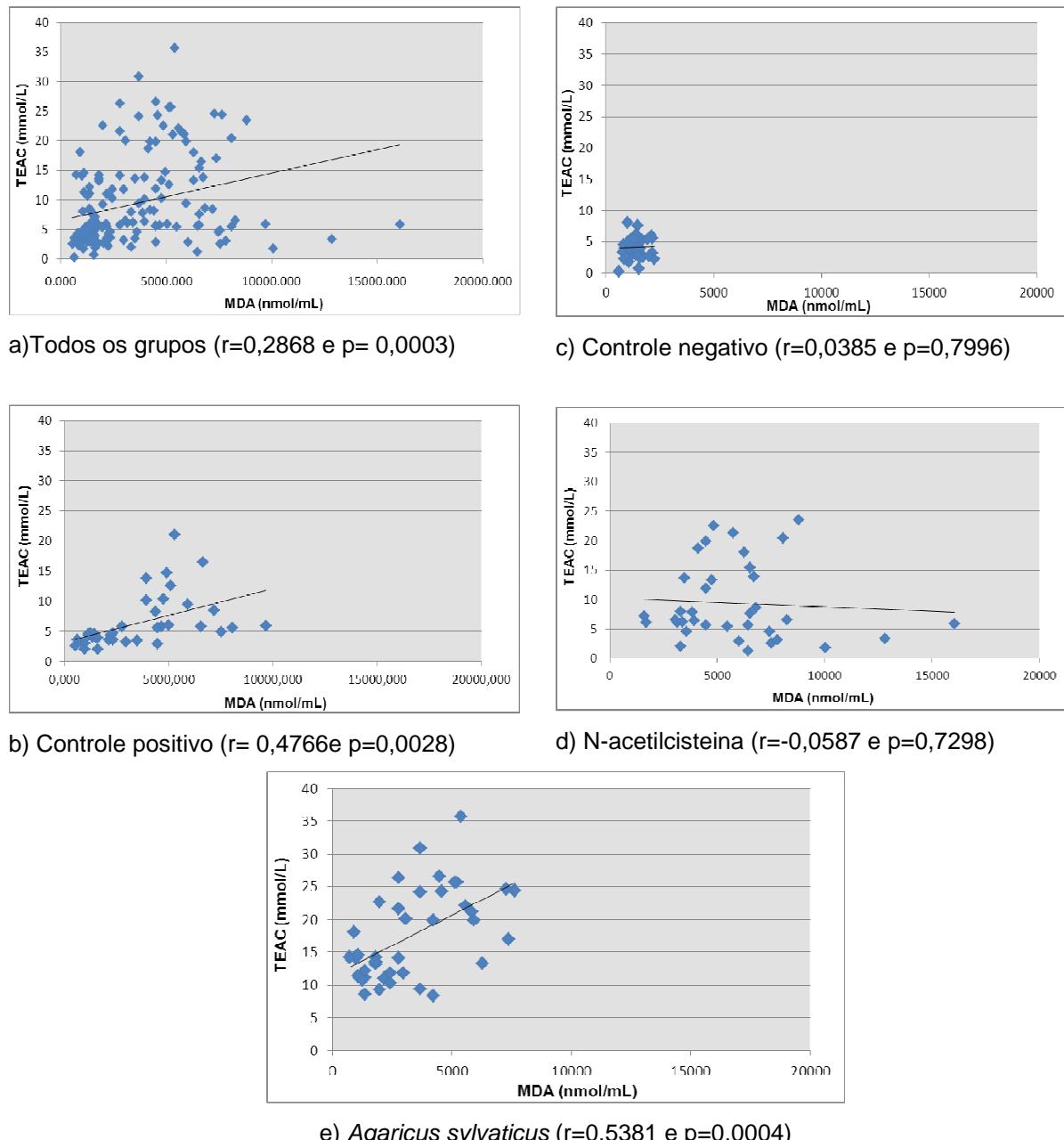


Figura 19: Correlação entre Malondialdeido (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteina (d) e *Agaricus sylvaticus*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

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

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

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

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

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

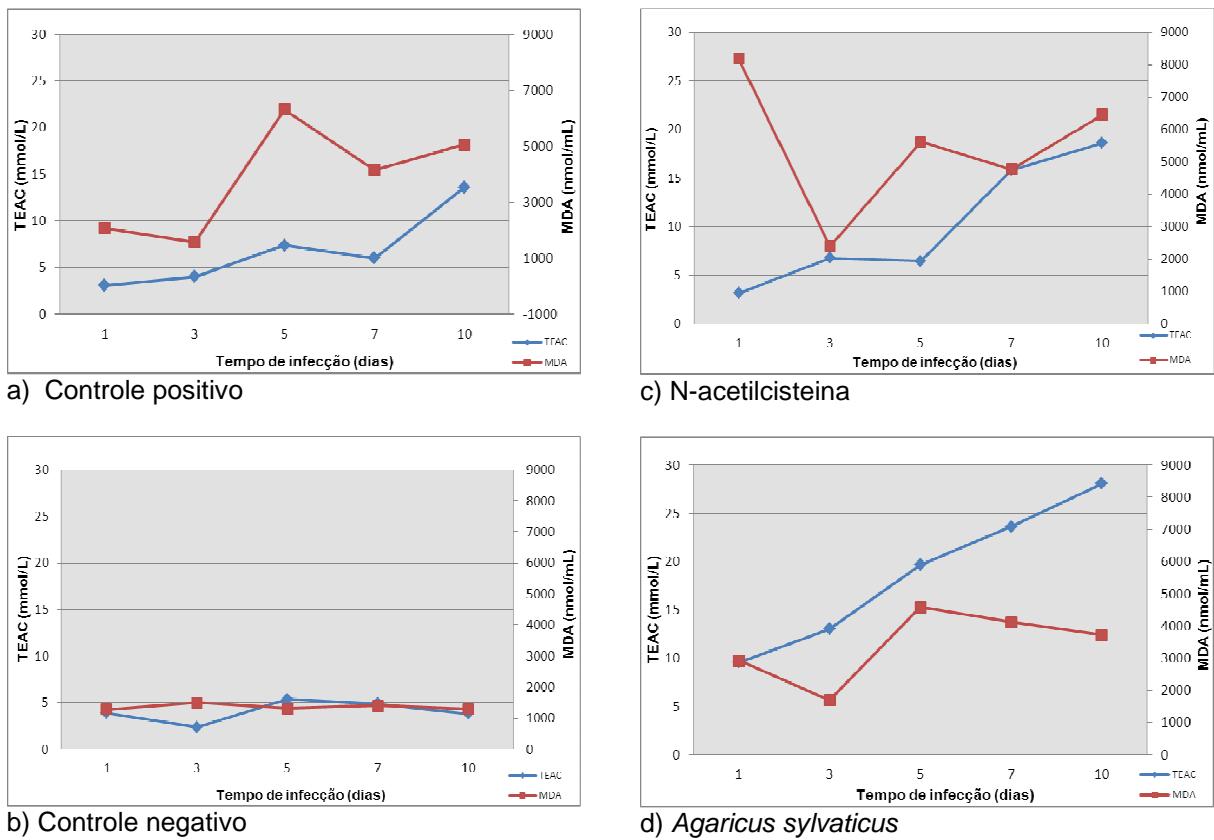


Figura 20- Comportamento de Malondialdeido (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

5.2.4.2- Correlação entre MDA e NO

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

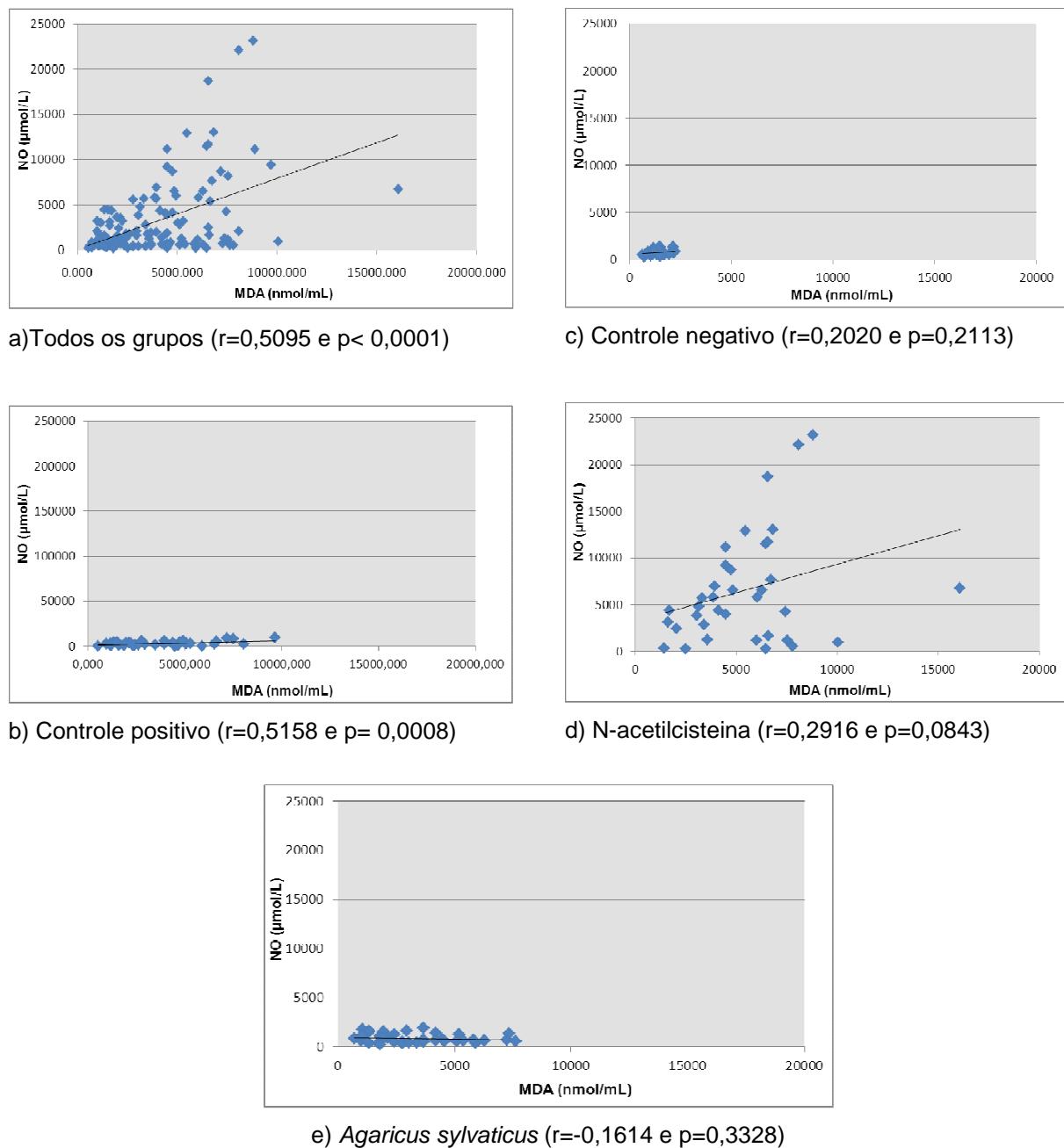


Figura 21: Correlação entre Malondialdeido (MDA) e óxido Nítrico (NO) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteina (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

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

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

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

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

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

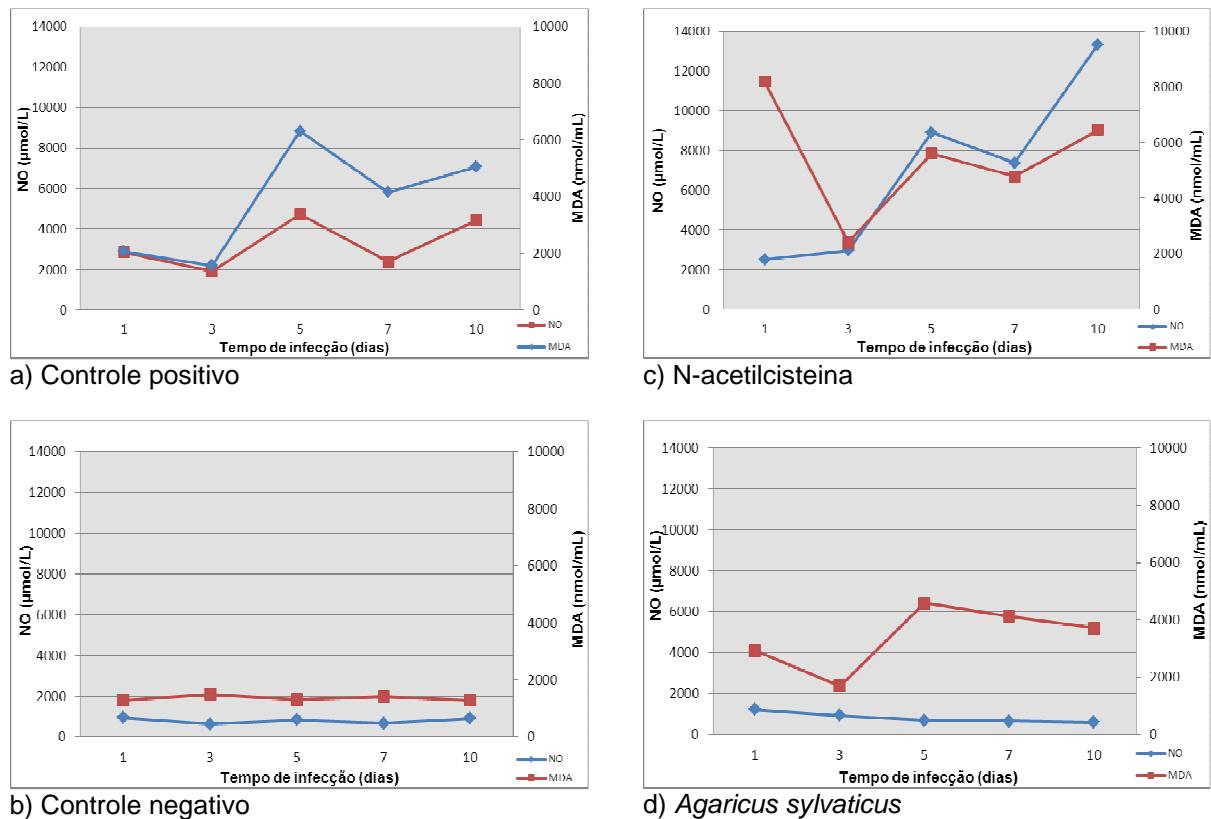


Figura 22- Comportamento de Malondialdeido (MDA) e óxido Nítrico (NO) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

5.2.4.3- Correlação entre TEAC e NO

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

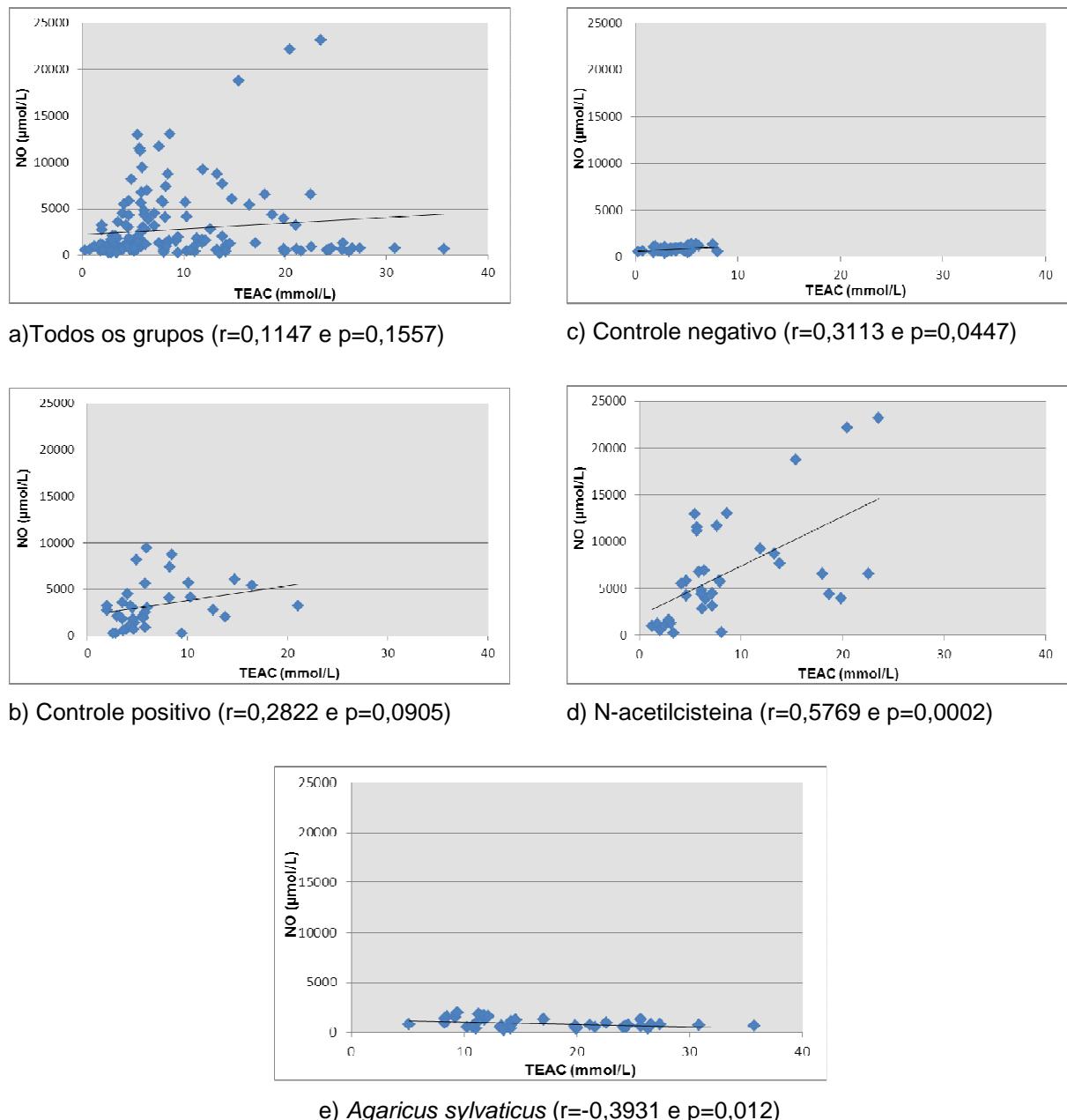


Figura 23: Correlação Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e óxido Nítrico (NO) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteina (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

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

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

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

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

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

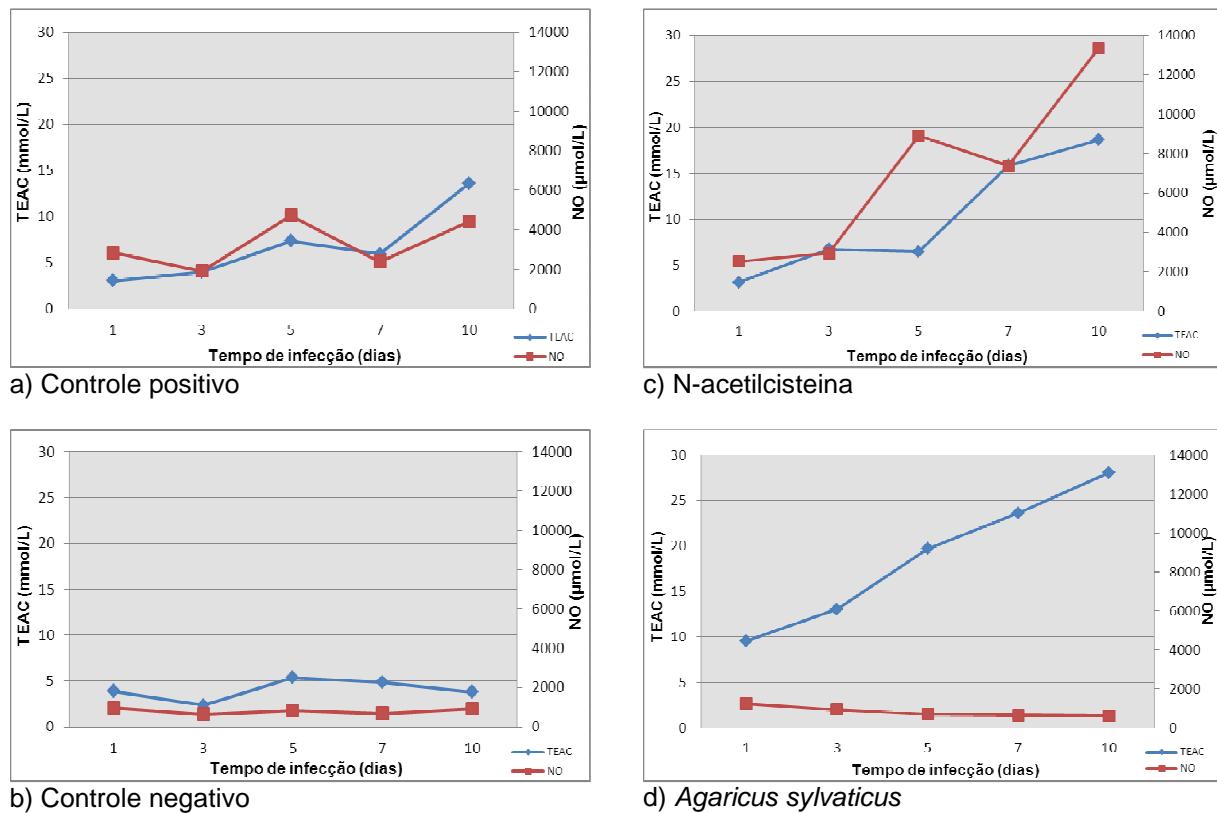


Figura 24- Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e óxido Nítrico (NO) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

5.2.4.4- Correlação entre Parasitemia e MDA

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

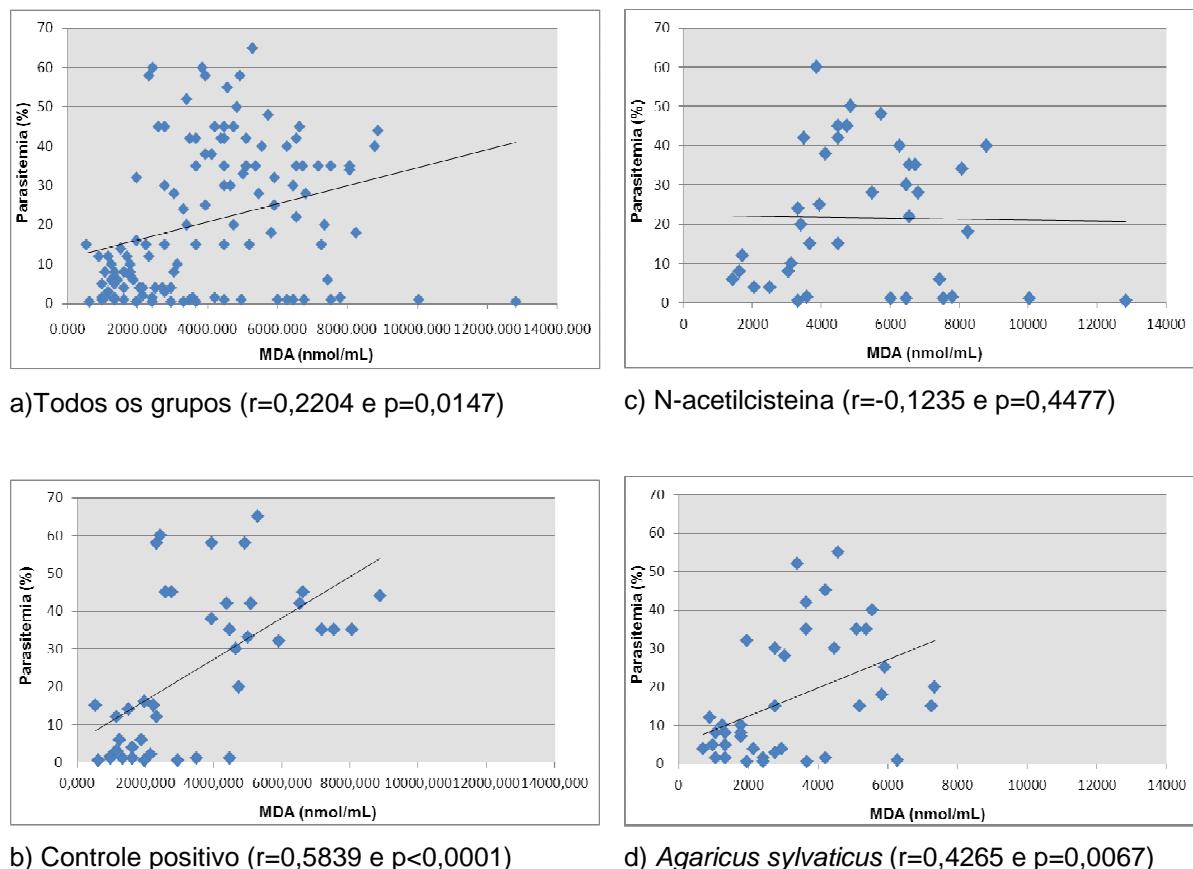


Figura 25: Correlação entre Parasitemia e Malondialdeído (MDA) nas amostras pulmonares dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

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

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

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

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

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

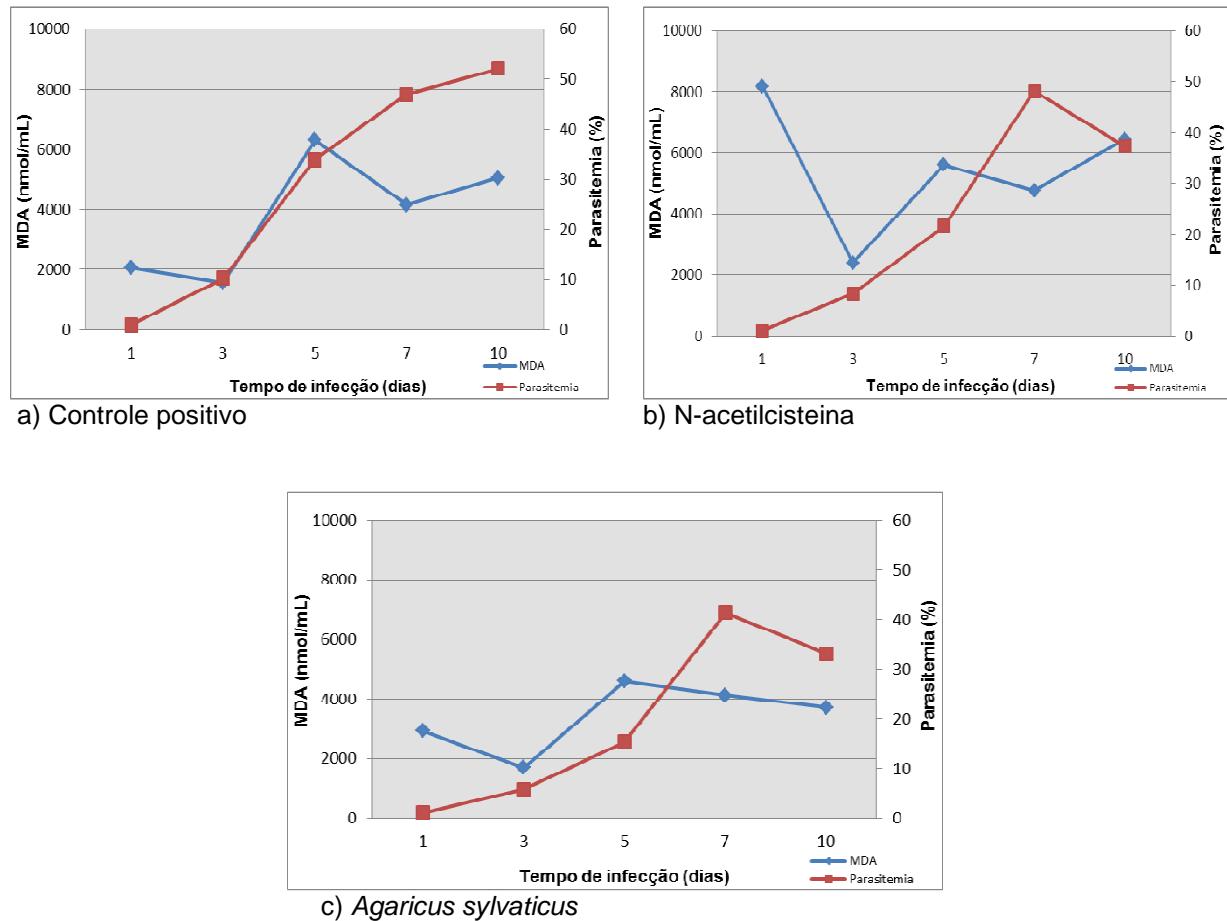


Figura 26: Comportamento da parasitemia e do Malondialdeido (MDA) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

5.2.4.5- Correlação entre Parasitemia e TEAC

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

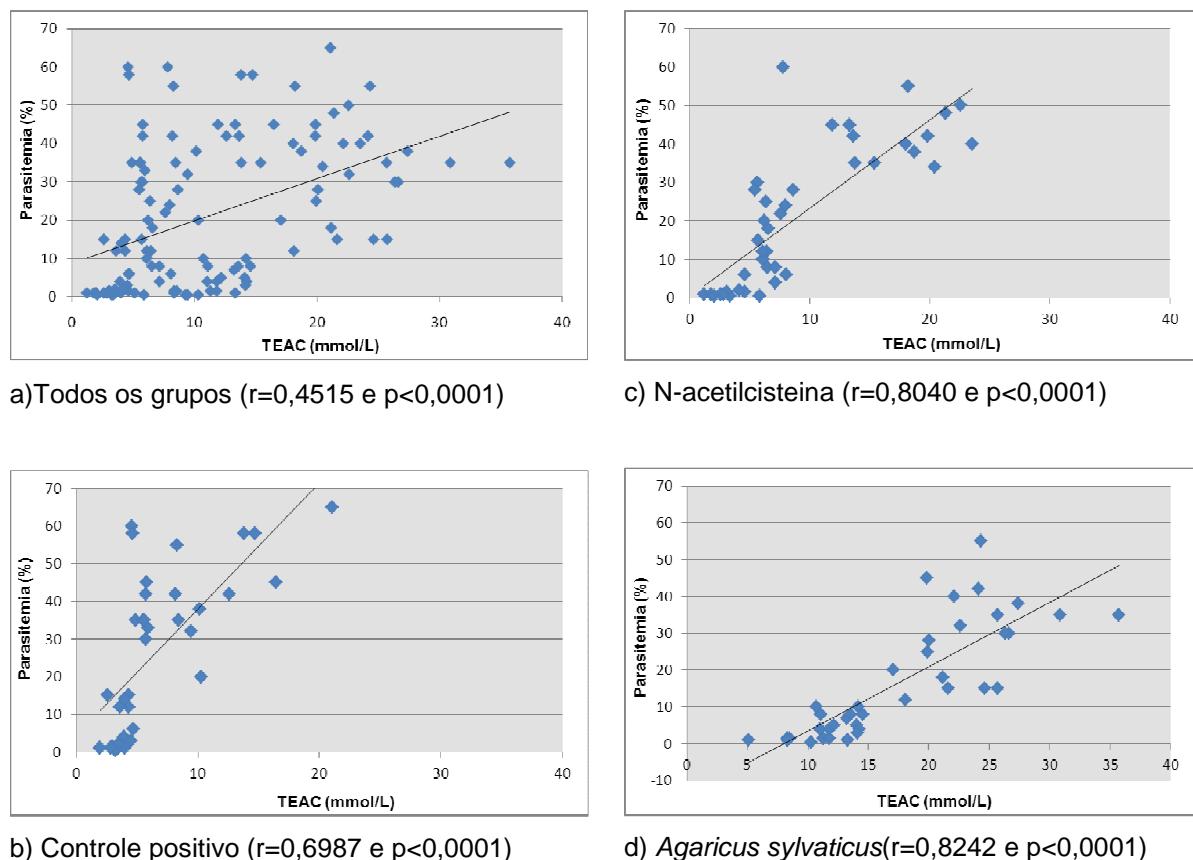


Figura 27: Correlação entre Parasitemia e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteina (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

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

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

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

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

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

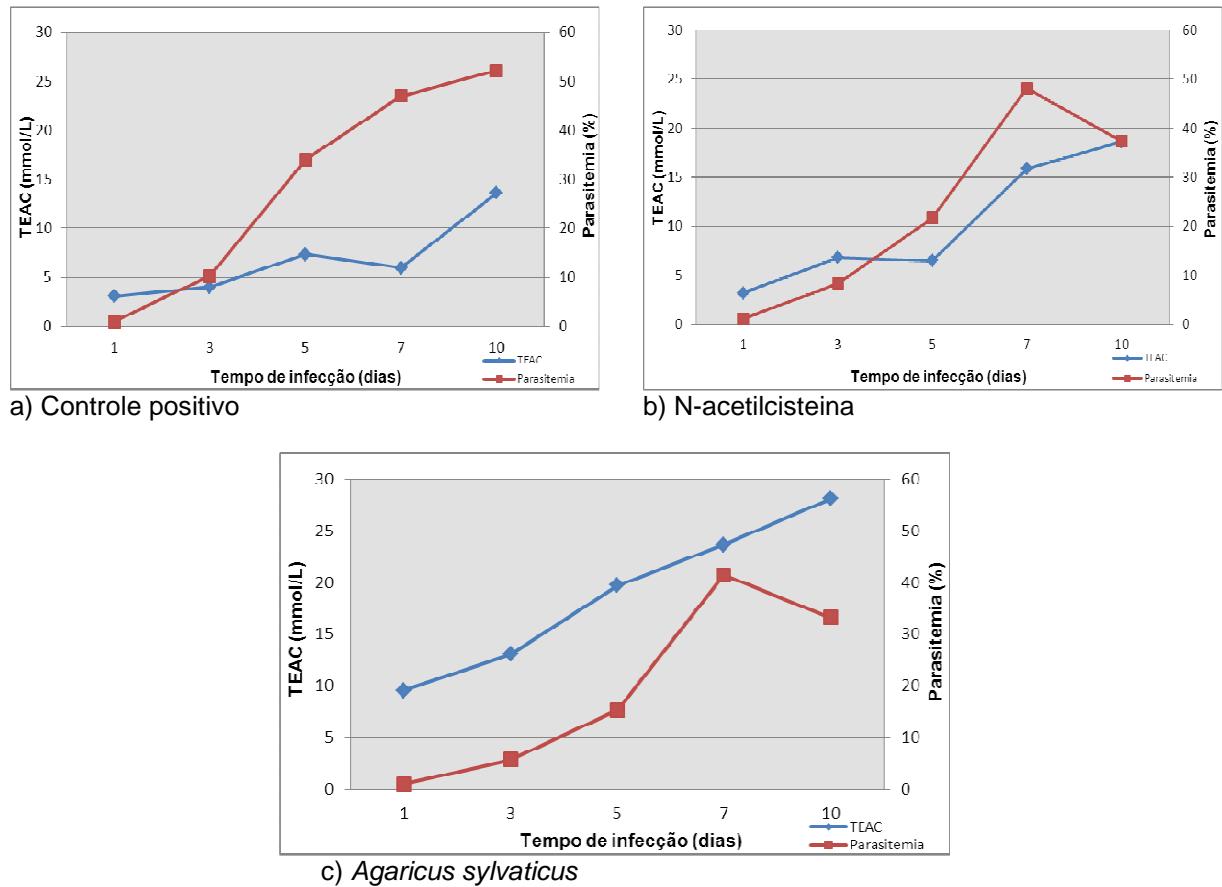
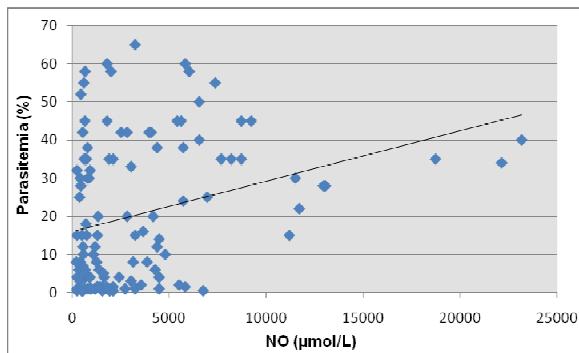


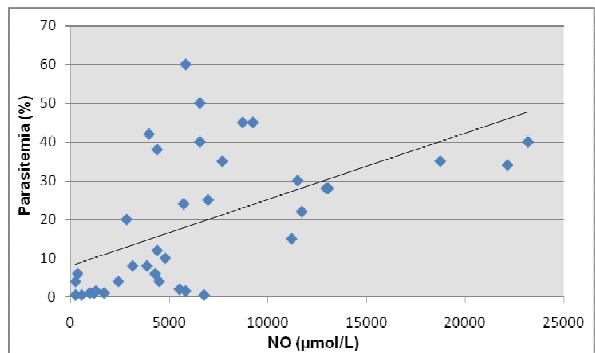
Figura 28: Comportamento da Parasitemia e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

5.2.4.6- Correlação entre Parasitemia e NO

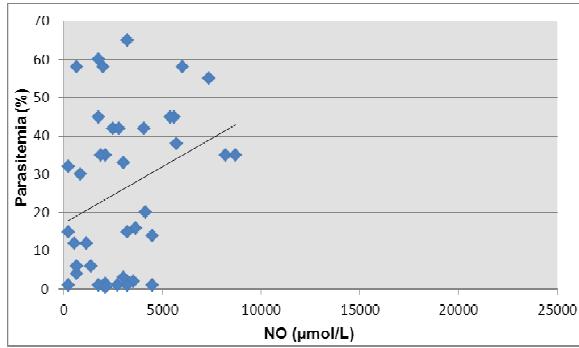
A figura 29 mostra a correlação entre Parasitemia e NO pulmonar dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d). A tabela 10 mostra a análise estatística referente a estas correlações.



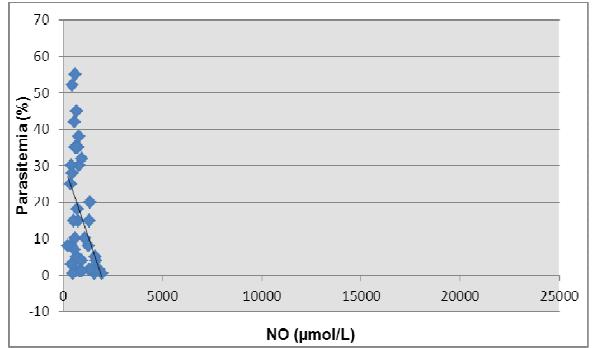
a) Todos os grupos ($r=0,2957$ e $p=0,0012$)



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



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



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

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

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

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

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

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

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

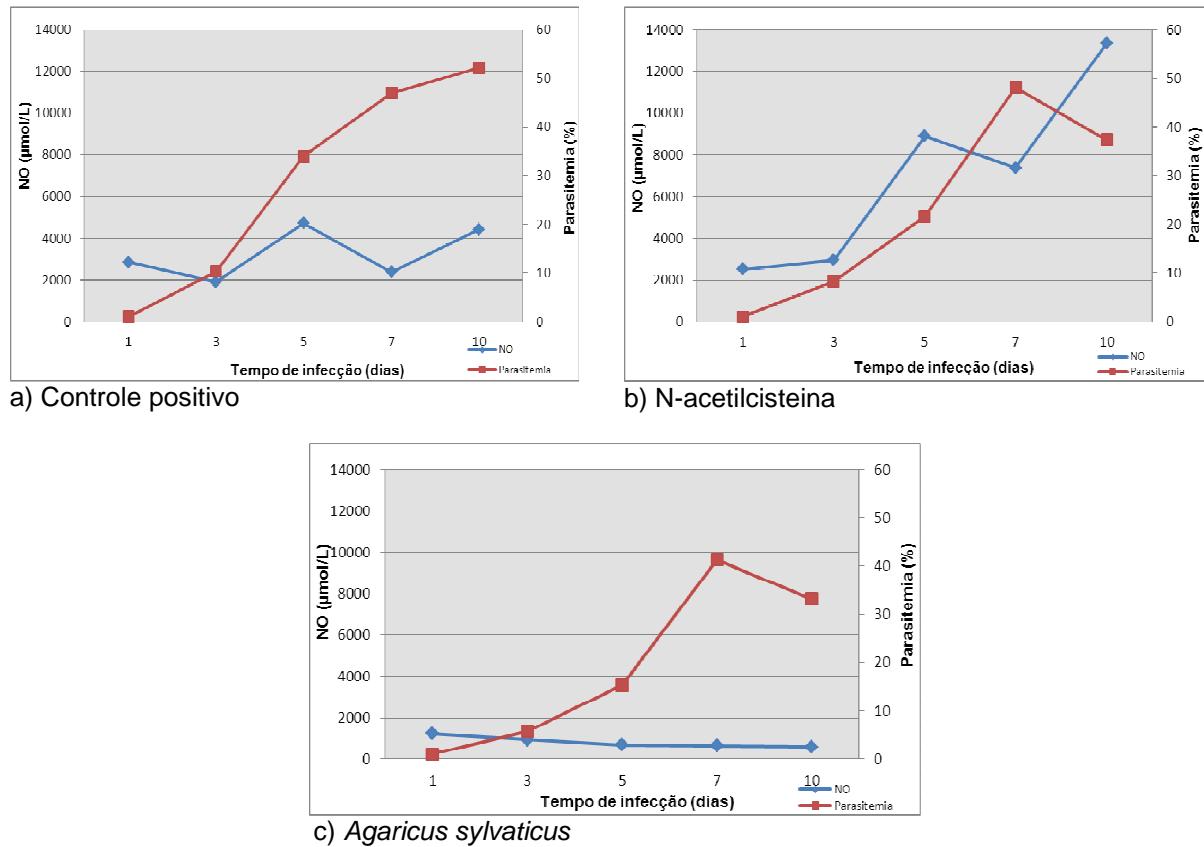


Figura 30: Valores de parasitemia e Óxido Nítrico (NO) pulmonar nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

5.3- DOSAGENS CEREBRAIS

5.3.1- Perfil do TEAC

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

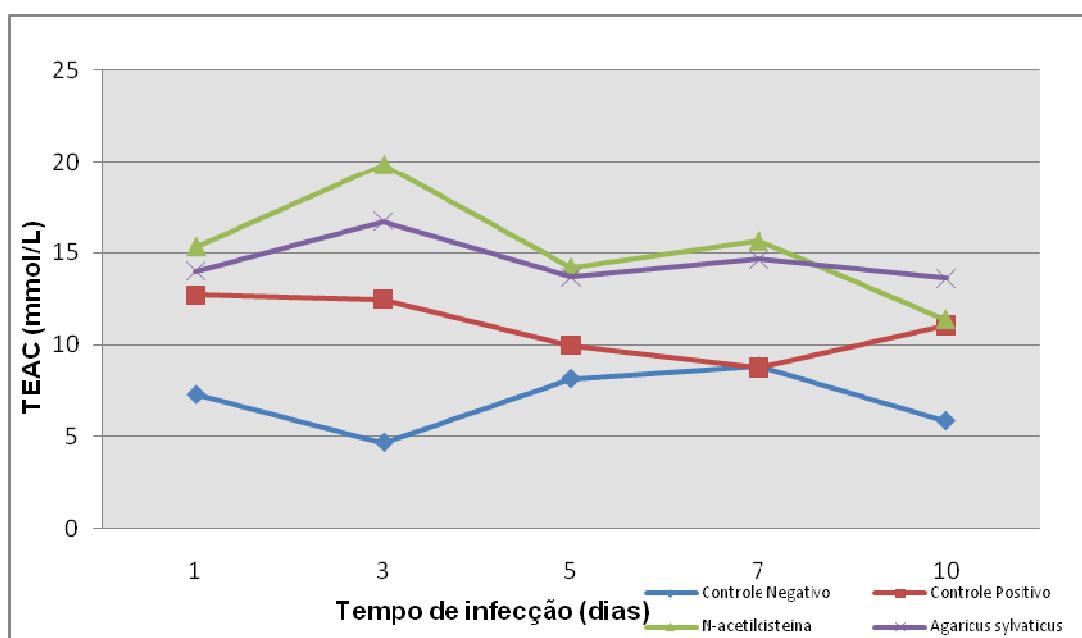


Figura 31 – Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral dos animais dos grupos controles e dos grupos de animais infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

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

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

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

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

5.3.2- Perfil do MDA

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

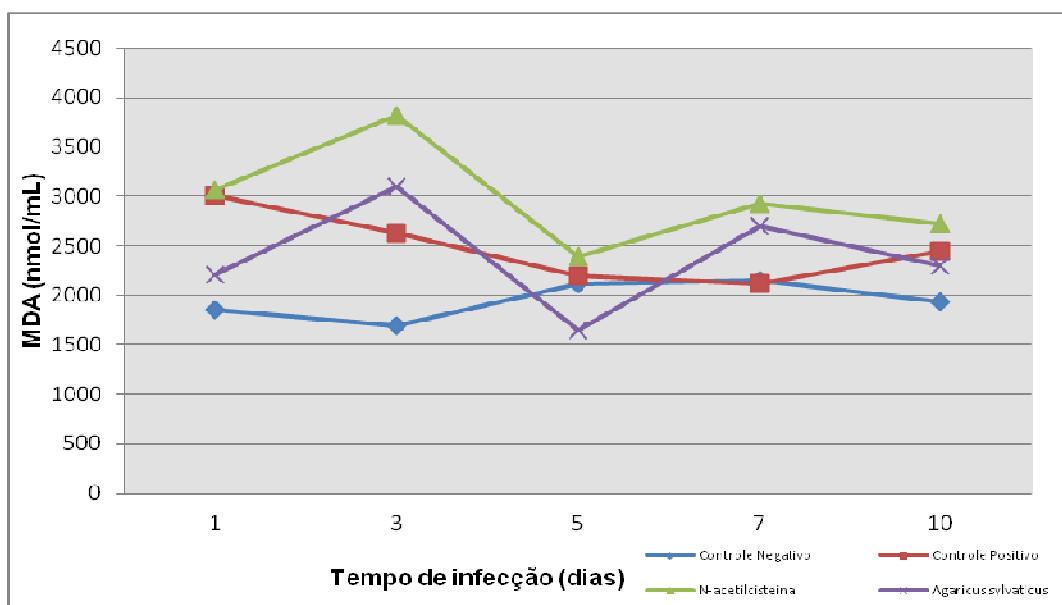


Figura 32- Comportamento do Malondialdeido (MDA) cerebral dos animais dos grupos controles e dos grupos infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

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

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

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

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

5.3.3- Perfil do NO

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

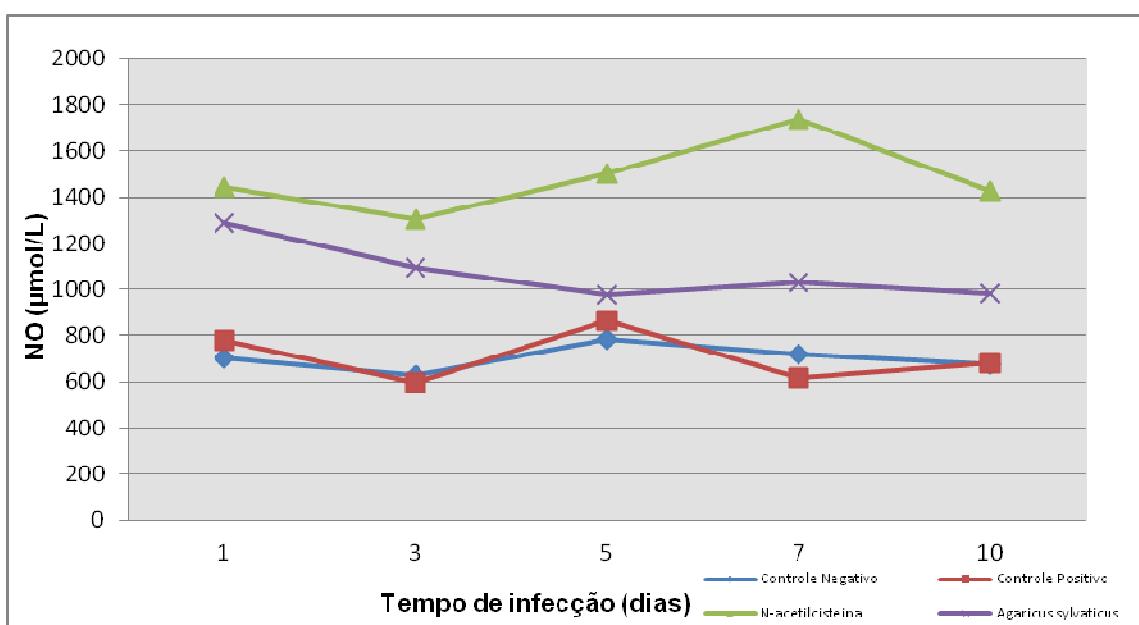


Figura 33- Comportamento do óxido Nítrico (NO) cerebral dos animais dos grupos controles e dos grupos infectados com o *P. berghei* e suplementados com antioxidantes.

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

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

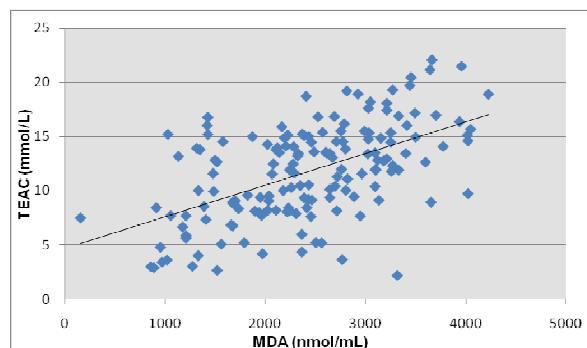
Grupo	NO ($\mu\text{mol/L}$)					<i>p</i> valor*
	1 dia	3 dias	5 dias	7 dias	10 dias	
CP	776 \pm 294 ^{#&}	594 \pm 42 ^{#@}	861 \pm 465 [#]	619 \pm 151 [#]	684 \pm 251 [#]	0,5279
CN	706 \pm 269 ^{#@}	628 \pm 175 ^{#@}	782 \pm 347 [#]	719 \pm 234 [#]	674 \pm 164 ^{#&}	0,7685
NAC	1443 \pm 479	1303 \pm 287	1502 \pm 248	1741 \pm 494	1429 \pm 96	0,9520
AS	1289 \pm 1534	1095 \pm 55	977 \pm 67 [#]	1032 \pm 176 [#]	982 \pm 129 [#]	0,0043

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

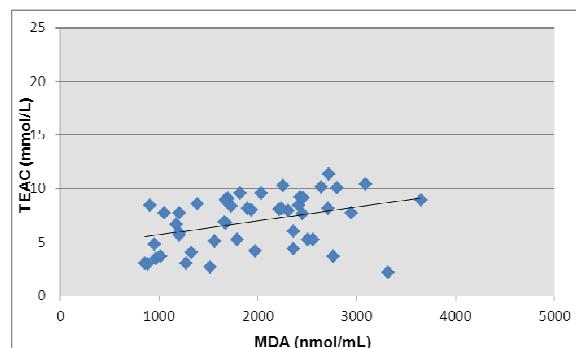
5.3.4- Estudo de Correlação em Amostras Cerebrais

5.3.4.1- Correlação entre MDA e TEAC

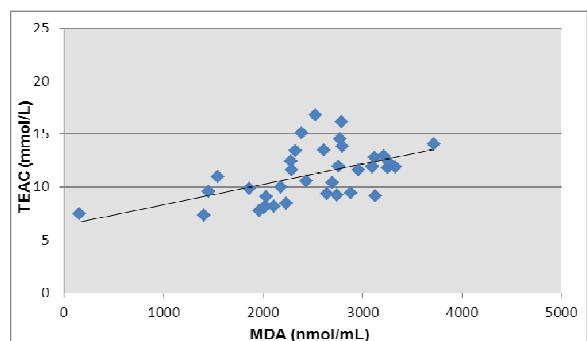
A figura 34 mostra a correlação entre MDA e TEAC nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a); bem como a correlação entre os dois parâmetros para cada grupo isoladamente (b, c, d, e). A tabela 14 mostra a análise estatística referente a estas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



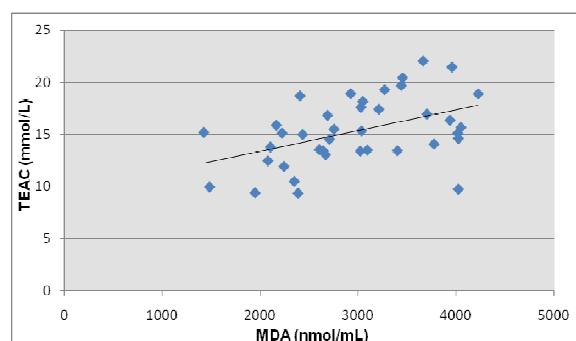
a) Todos os grupos ($r=0,5450$ e $p<0,0001$)



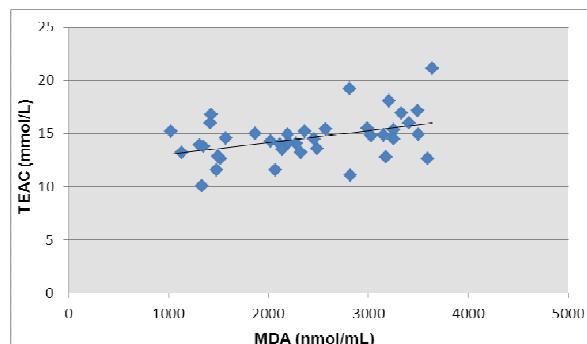
c) Controle negativo ($r=0,3712$ e $p=0,0086$)



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



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



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

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

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

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

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

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

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

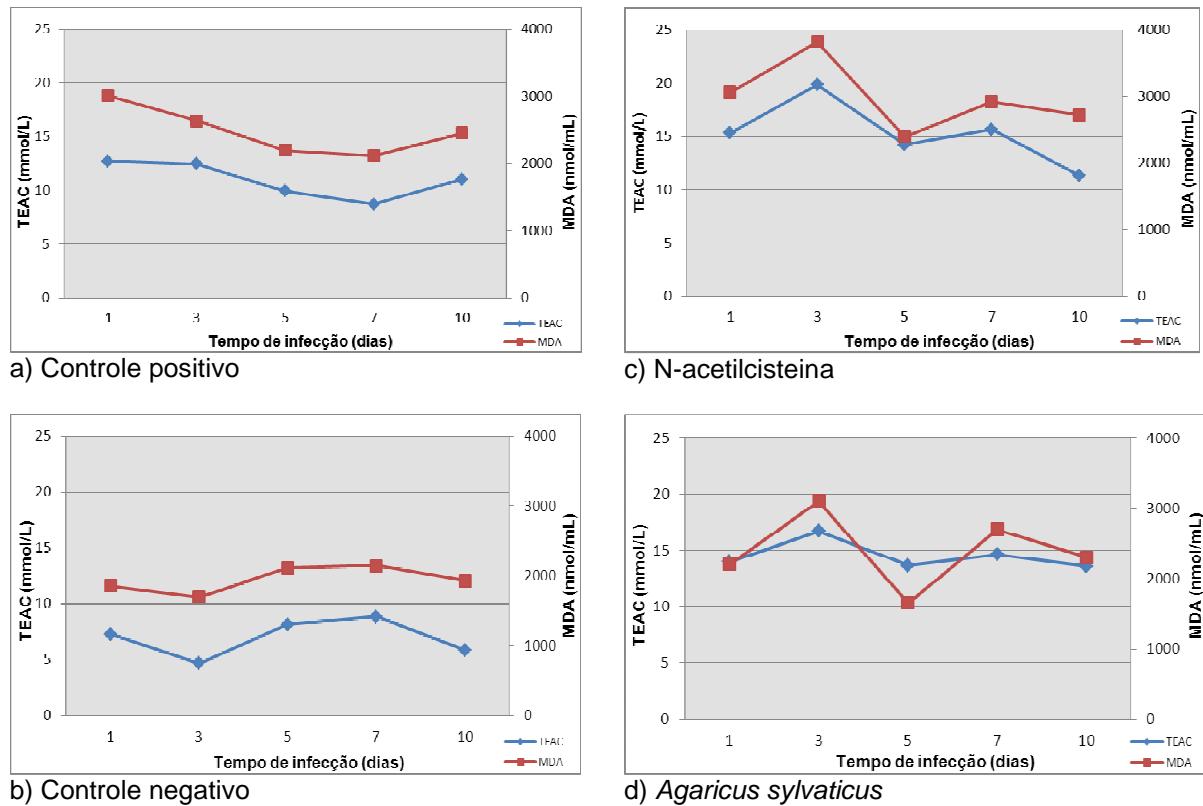


Figura 35- Comportamento de Malondialdeido (MDA) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

5.3.4.2- Correlação entre MDA e NO

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

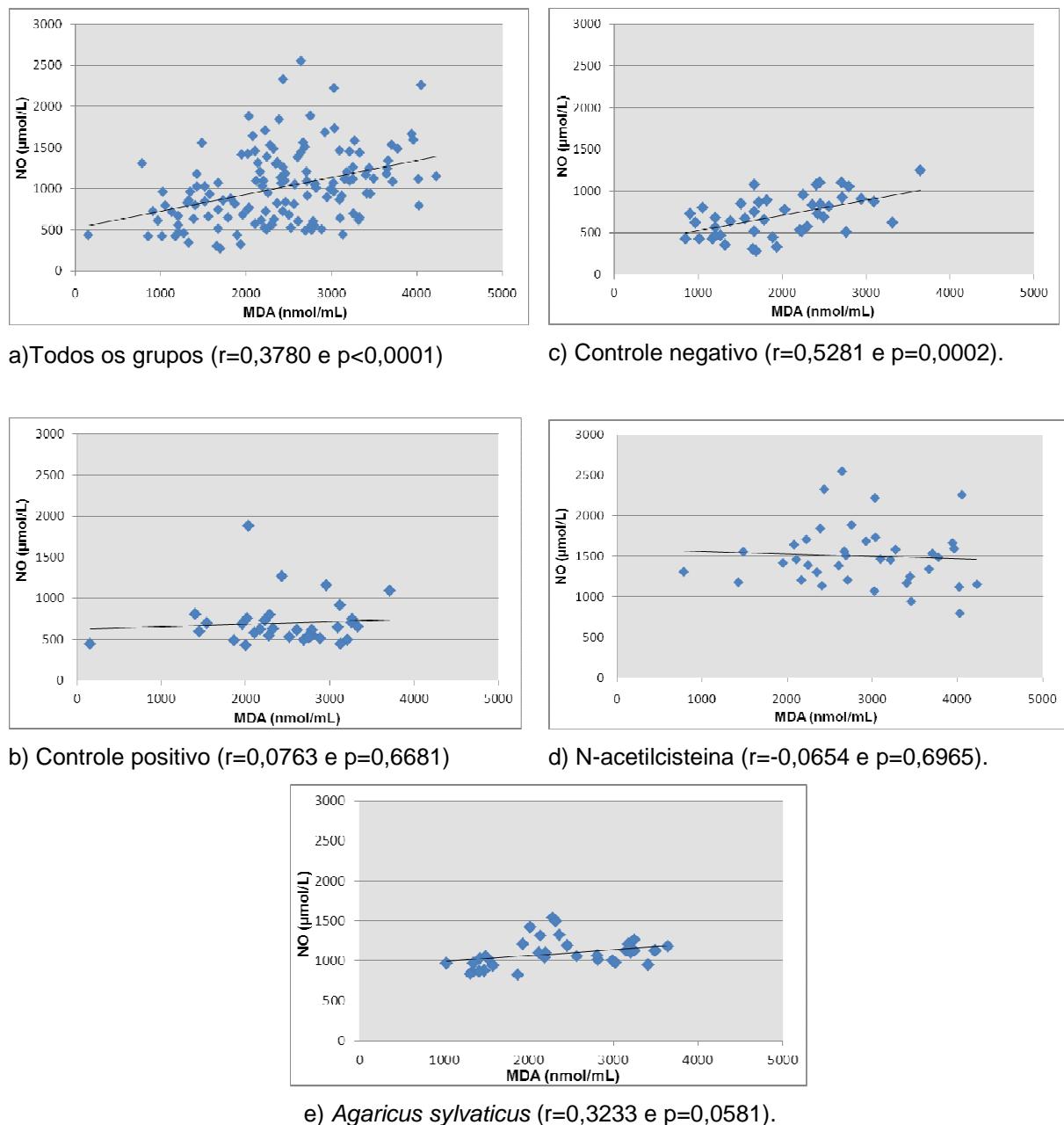


Figura 36: Correlação entre Malondialdeido (MDA) e Óxido Nítrico (NO) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteina (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

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

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

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

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

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

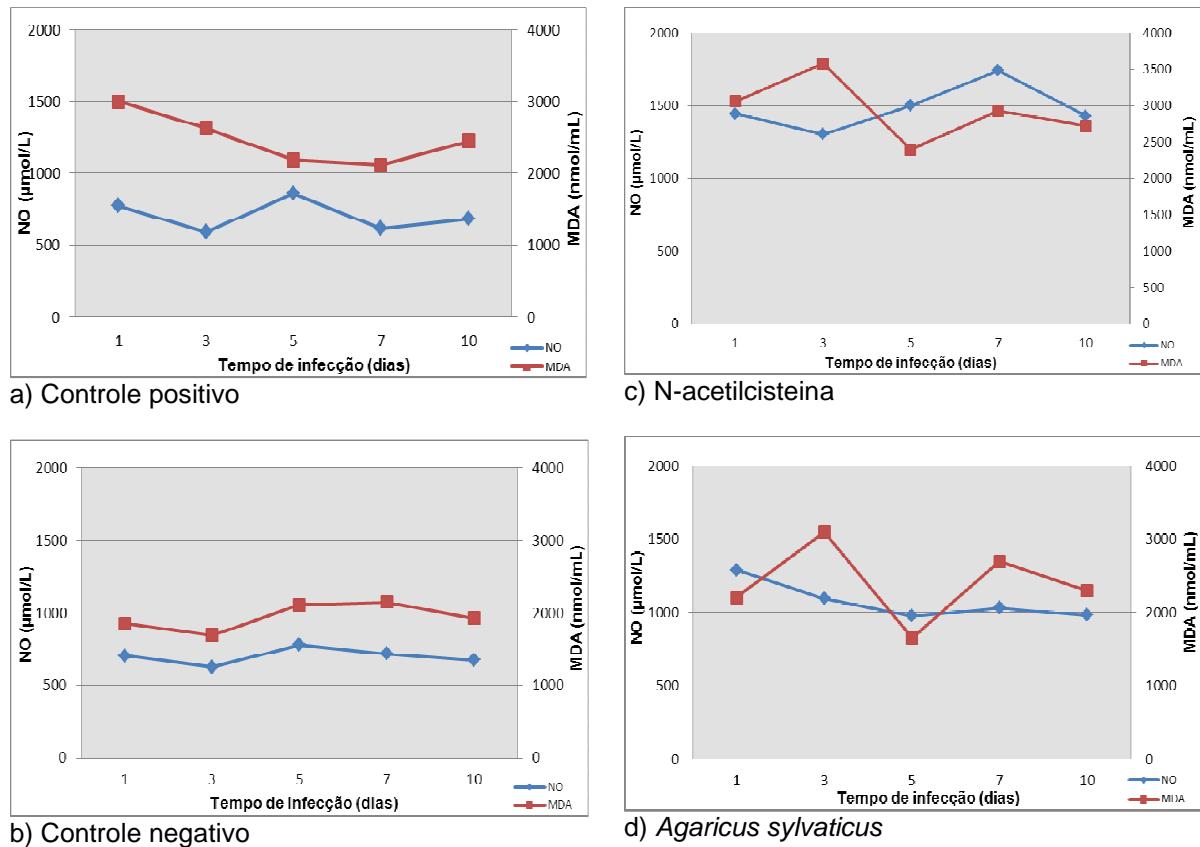


Figura 37- Comportamento de Malondialdeido (MDA) e Óxido Nítrico (NO) cerebral nos animais para cada grupo, em função do tempo de infecção.

5.3.4.3- Correlação entre TEAC e NO

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

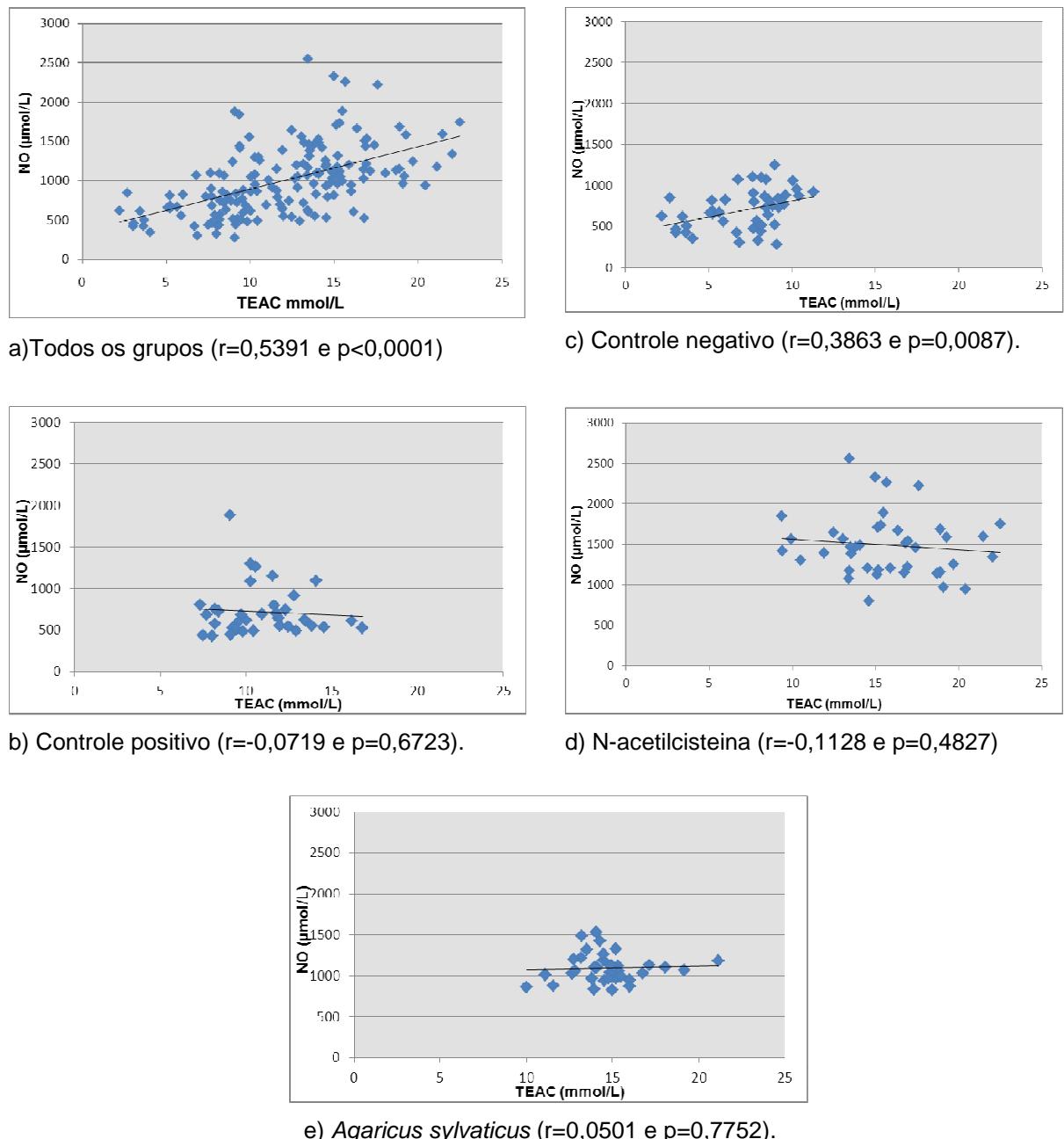


Figura 38: Correlação entre Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e Óxido Nítrico (NO) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b), Controle Negativo (c); N-acetilcisteina (d) e *Agaricus sylvaticus* (e).

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

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

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

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

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

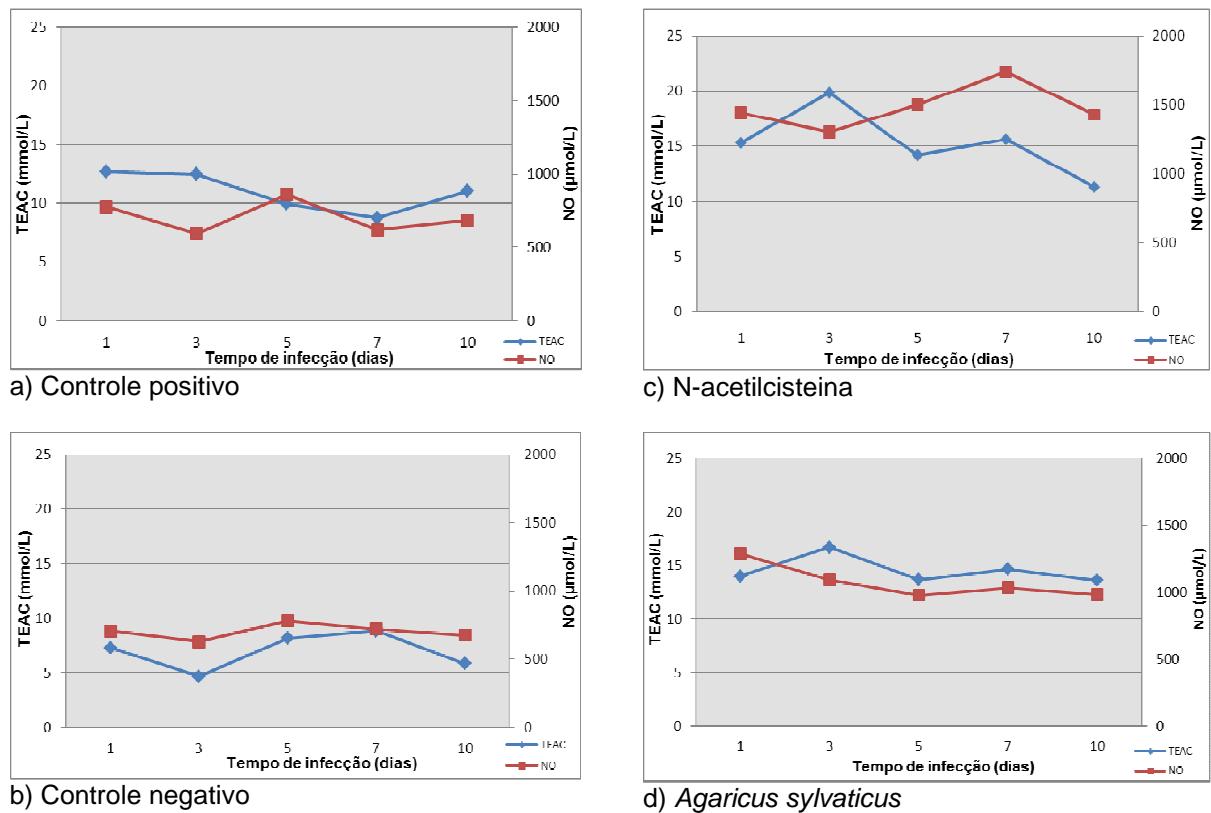


Figura 39- Comportamento da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) e do Óxido Nítrico (NO) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

5.3.4.4- Correlação entre Parasitemia e MDA

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

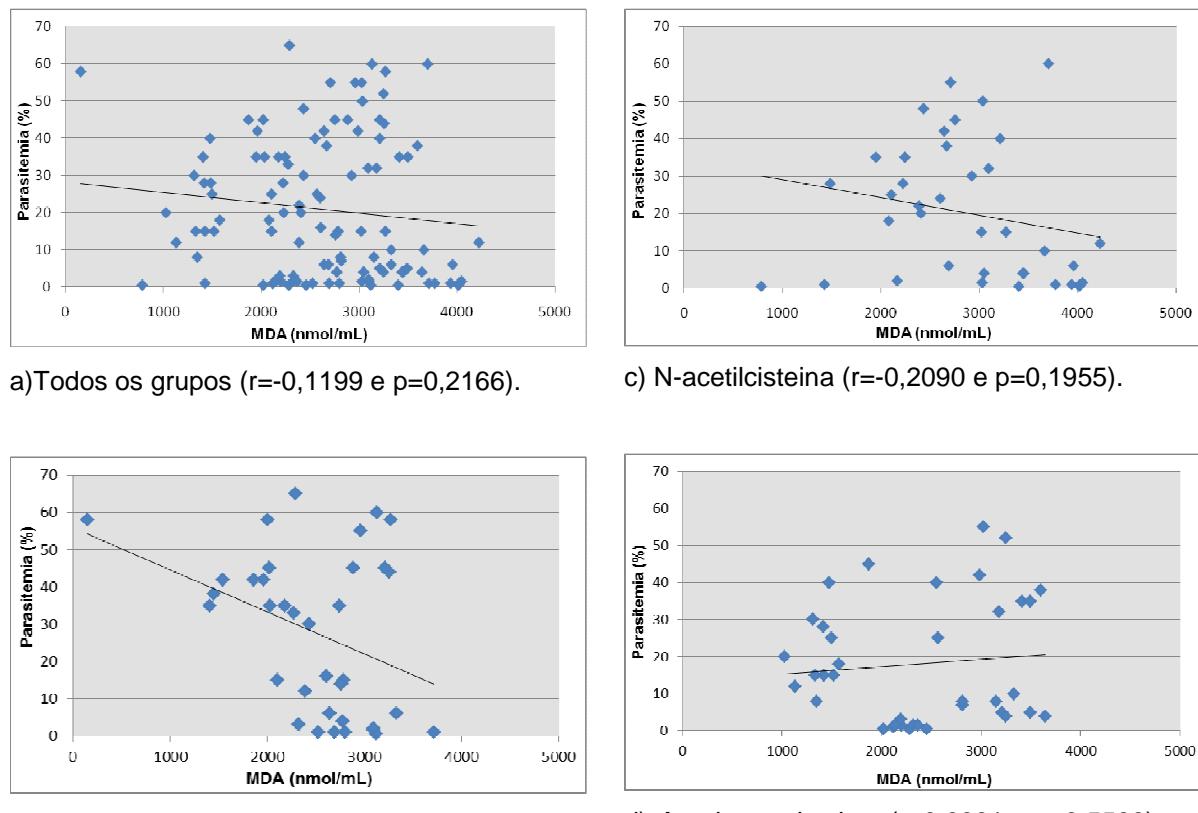


Figura 40: Correlação entre Parasitemia e Malondialdeído (MDA) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se todos os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

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

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

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

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

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

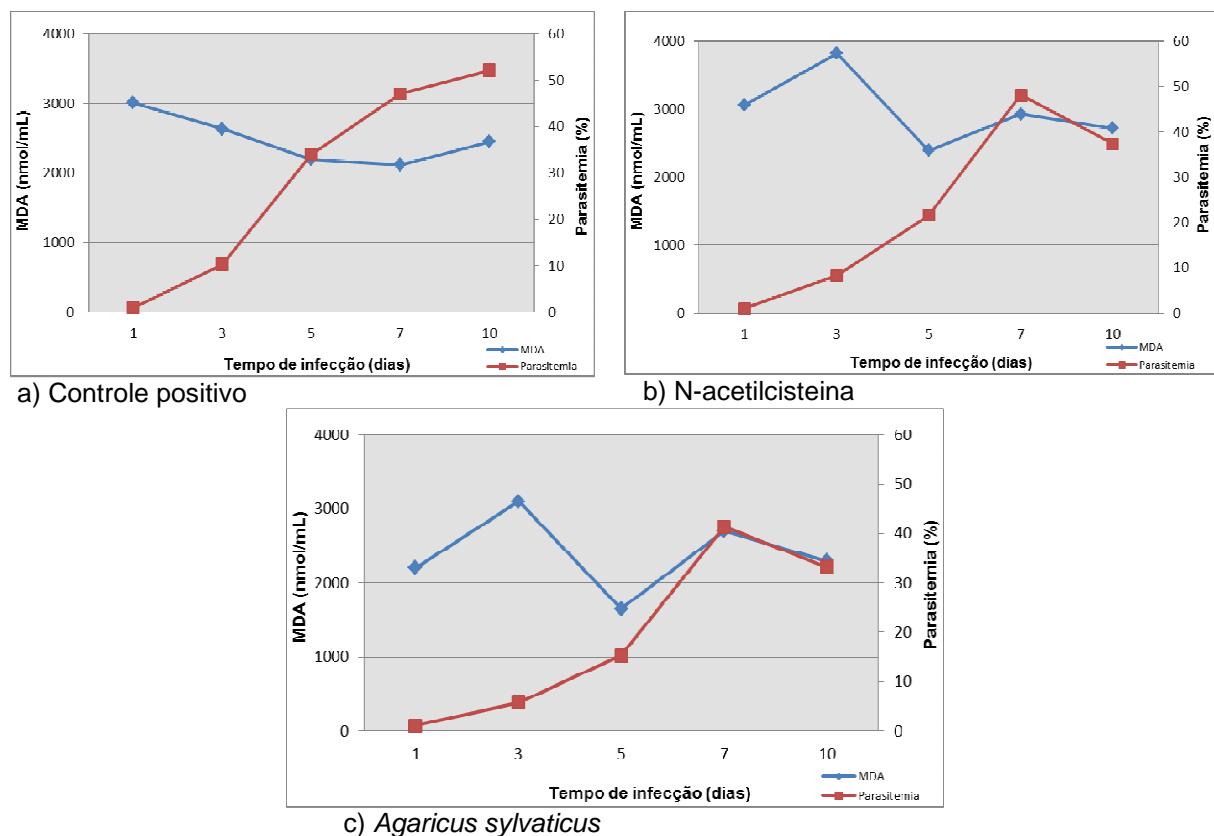


Figura 41- Comportamento da Parasitemia e do Malondialdeido (MDA) cerebral nos animais para cada grupo, em função do tempo de infecção.

5.3.4.5- Correlação entre Parasitemia e TEAC

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

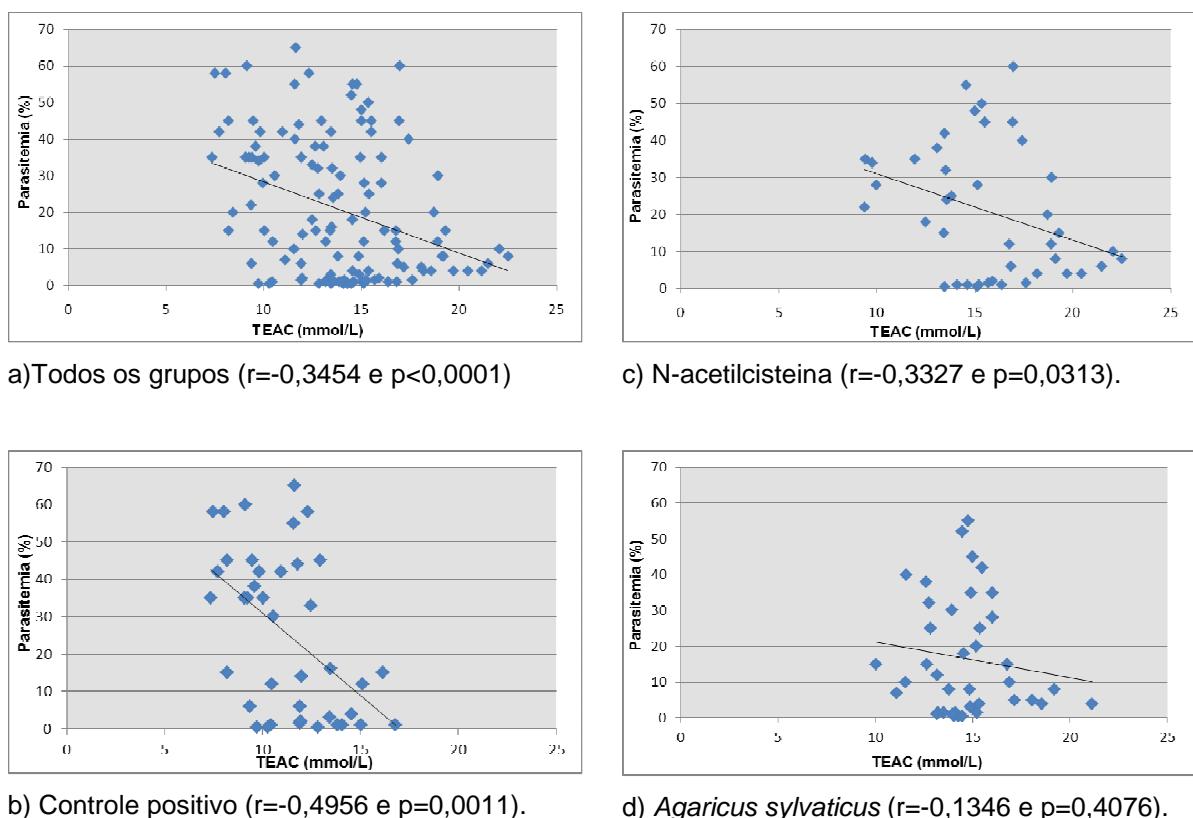


Figura 42: Correlação entre Parasitemia e Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteína (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

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

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

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

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

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

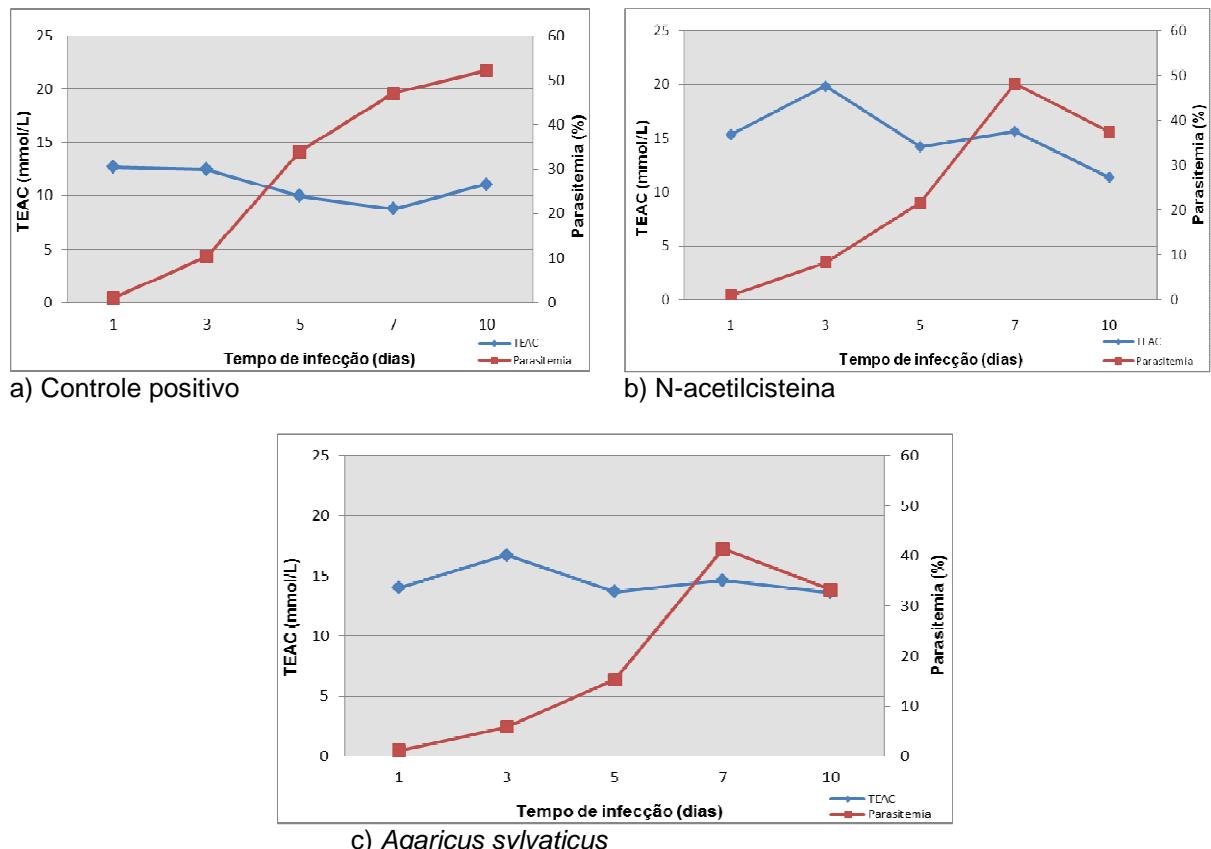


Figura 43- Comportamento da Parasitemia e da Capacidade antioxidantte Equivalente ao Trolox (TEAC) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

5.3.4.6- Correlação entre Parasitemia e NO

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

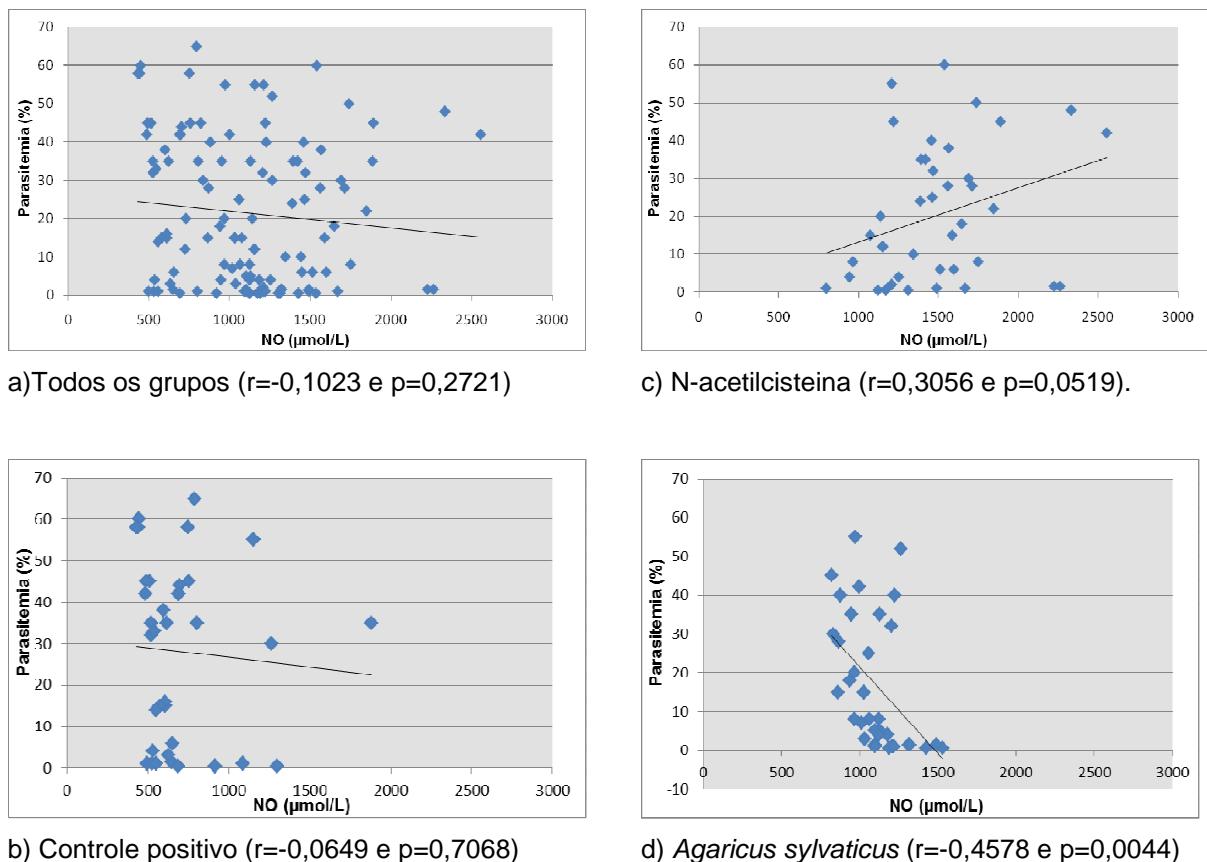


Figura 44: Correlação entre Parasitemia e Óxido Nítrico (NO) nas amostras cerebrais dos camundongos, considerando-se os animais de todos os grupos simultaneamente (a), Controle positivo (b); N-acetilcisteina (c) e *Agaricus sylvaticus* (d).

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

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

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

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

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

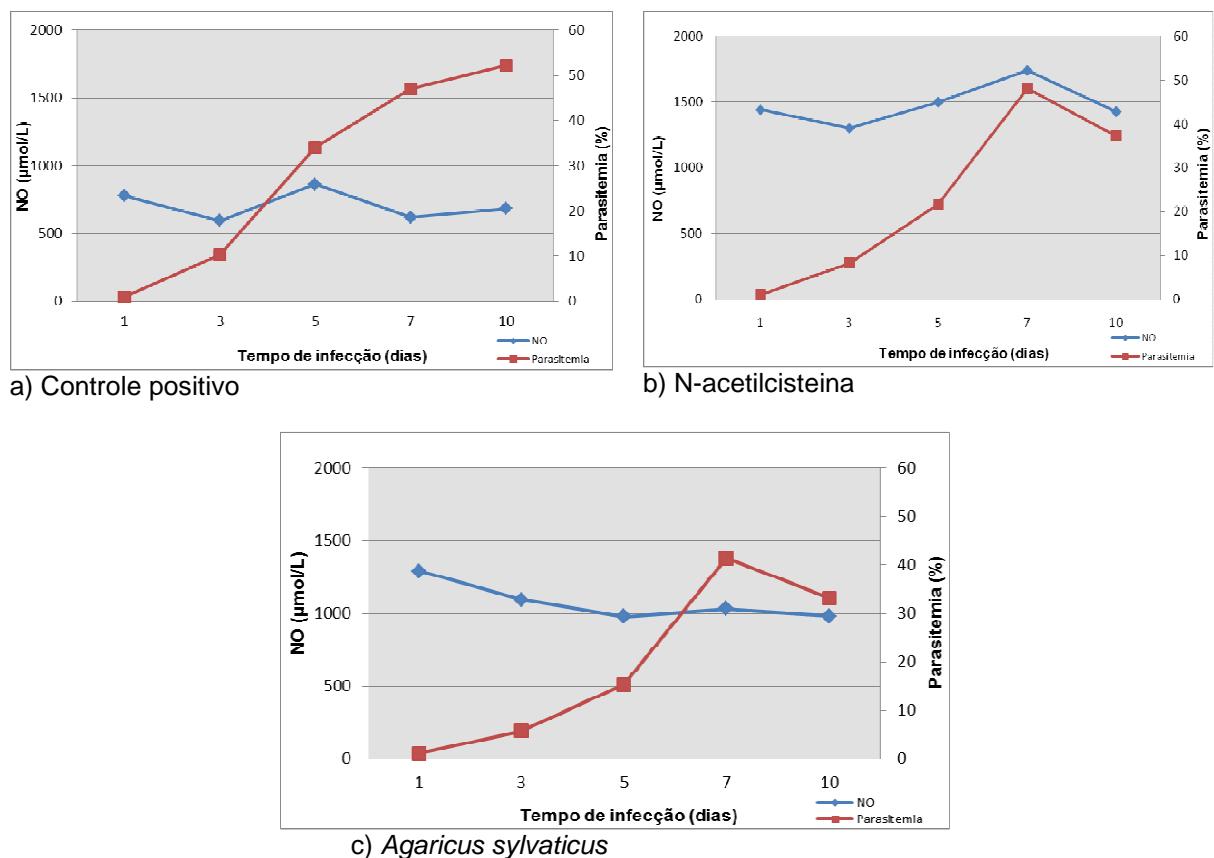


Figura 45- Comportamento da Parasitemia e do Óxido Nítrico (NO) cerebral nos animais para cada grupo em função do tempo de infecção.

5.3.5 – Correlação entre Pulmão e Cérebro

5.3.5.2- Correlação entre TEAC Pulmonar e Cerebral

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

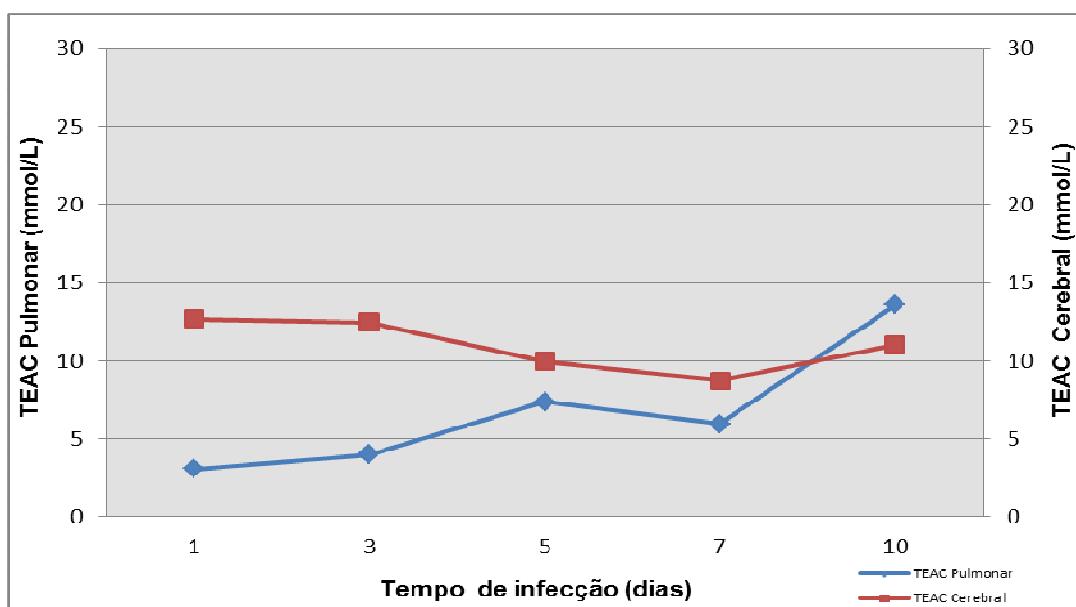


Figura 46: Comportamento da Capacidade antioxidantte Equivalente ao Trolox (TEAC) entre pulmão e cérebro no grupo controle positivo.

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

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

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

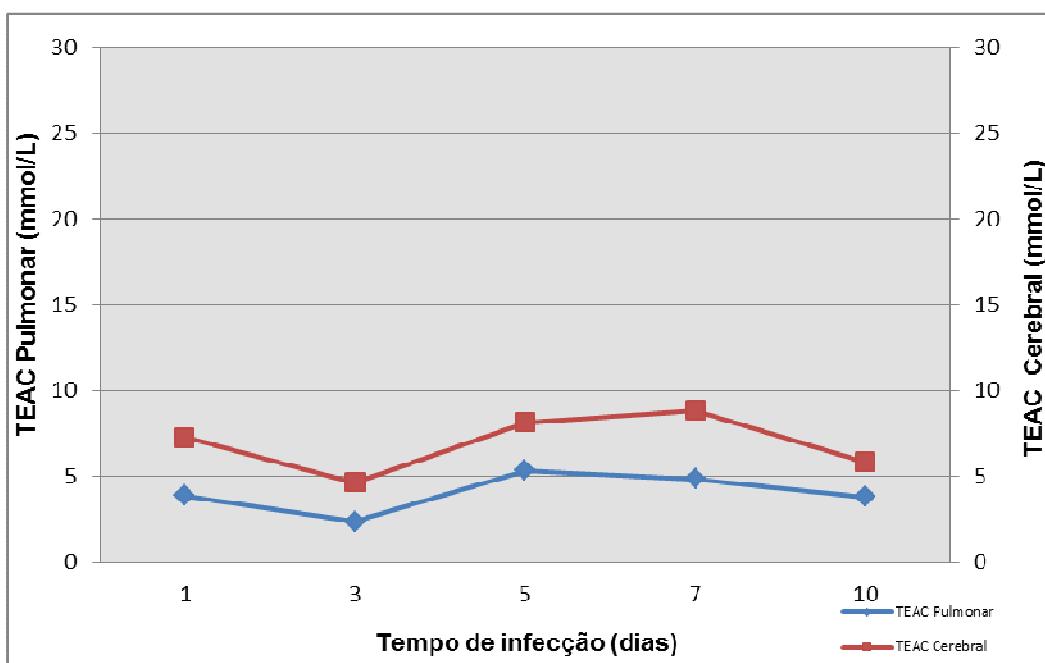


Figura 47: Comportamento da Capacidade antioxidantte Equivalente ao Trolox (TEAC) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle negativo.

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

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

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

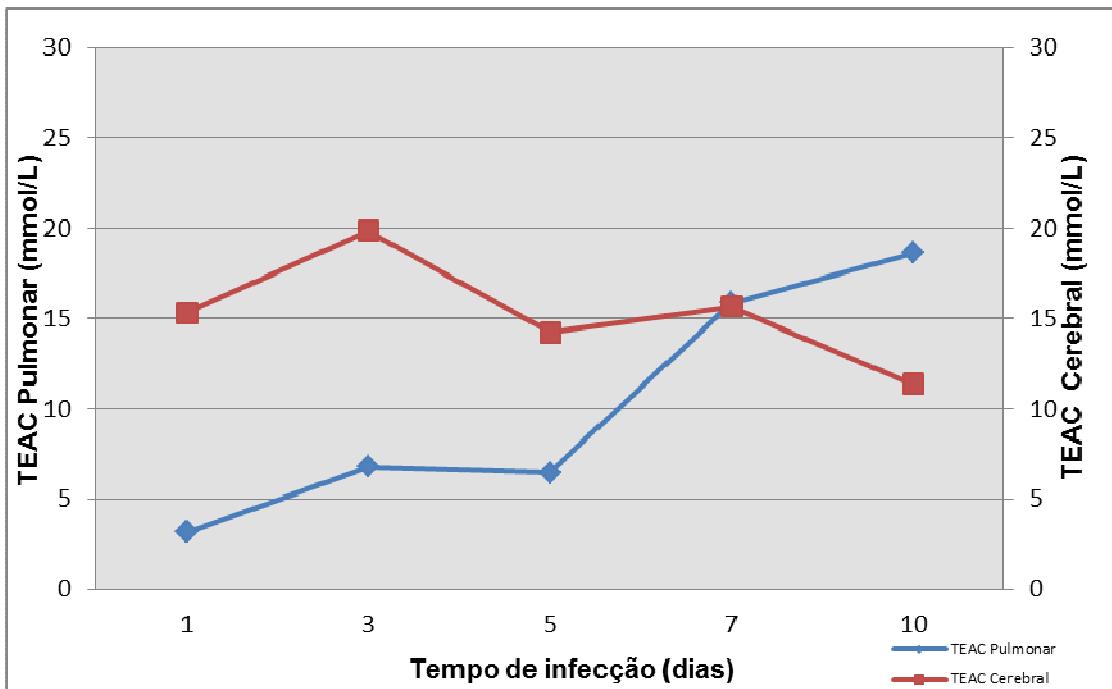


Figura 48: Comportamento da Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com N-acetilcisteina.

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

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

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

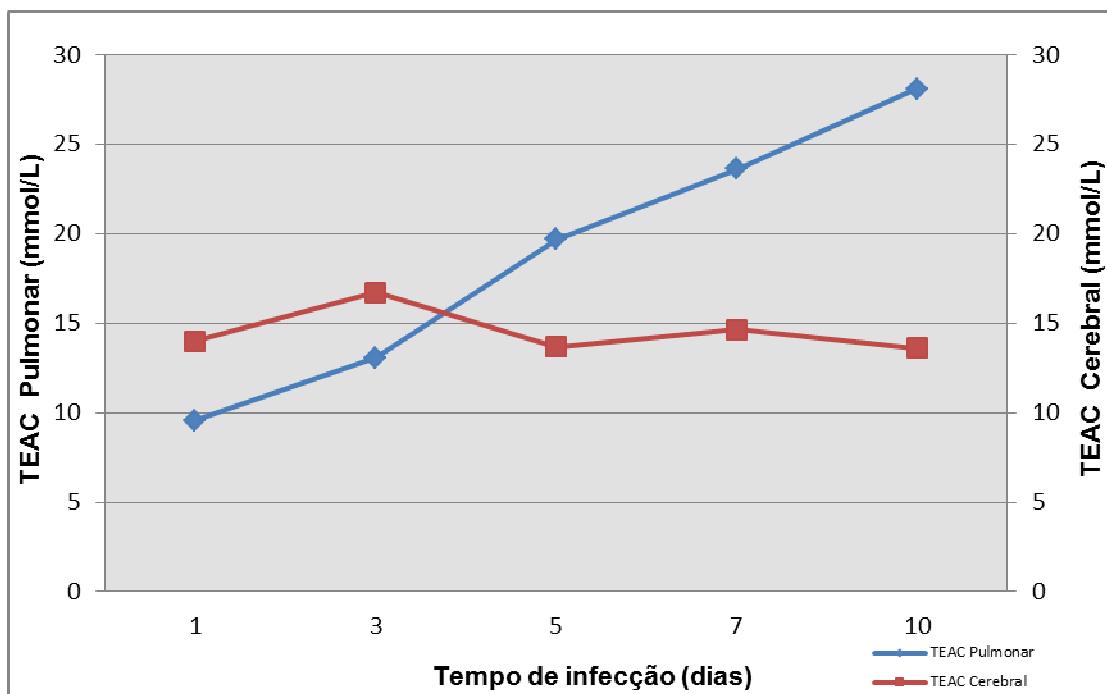


Figura 49: Comportamento da Capacidade antioxidantte Equivalente ao Trolox (TEAC) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com *Agaricus sylvaticus*.

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

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

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

5.3.5.1- Correlação entre MDA Pulmonar e Cerebral

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

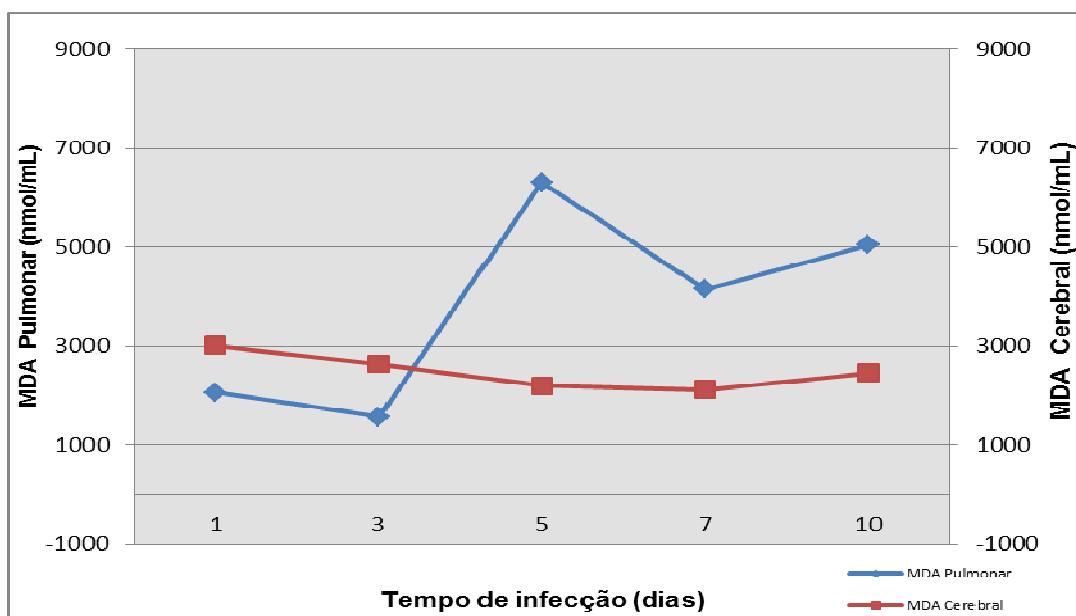


Figura 50: Comportamento do Malondialdeido (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle positivo.

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

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

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

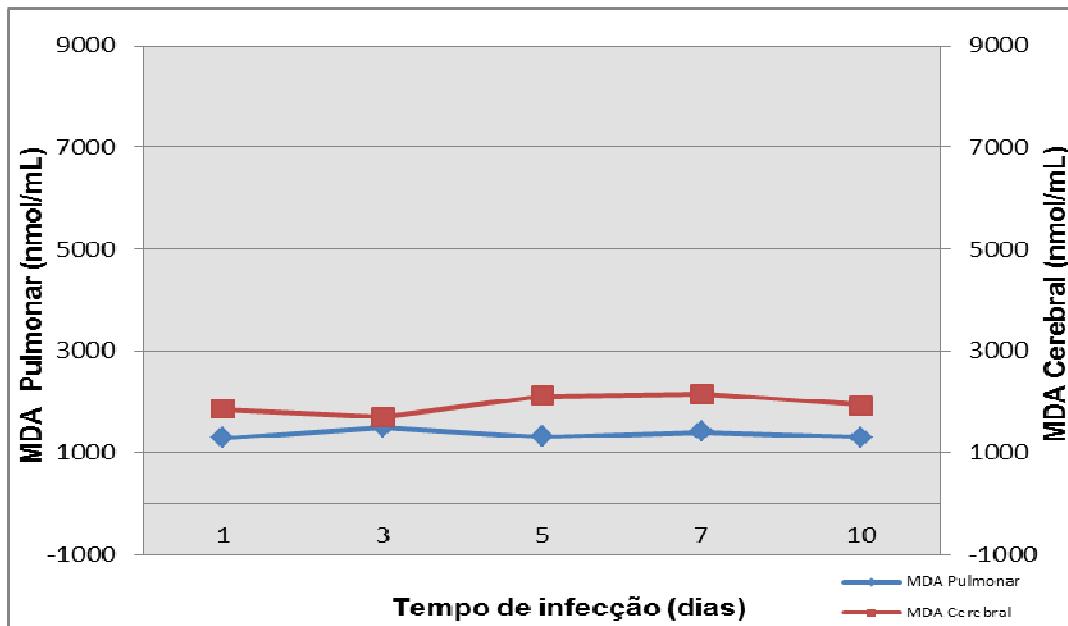


Figura 51: Comportamento do Malondialdeido (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle negativo.

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

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

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

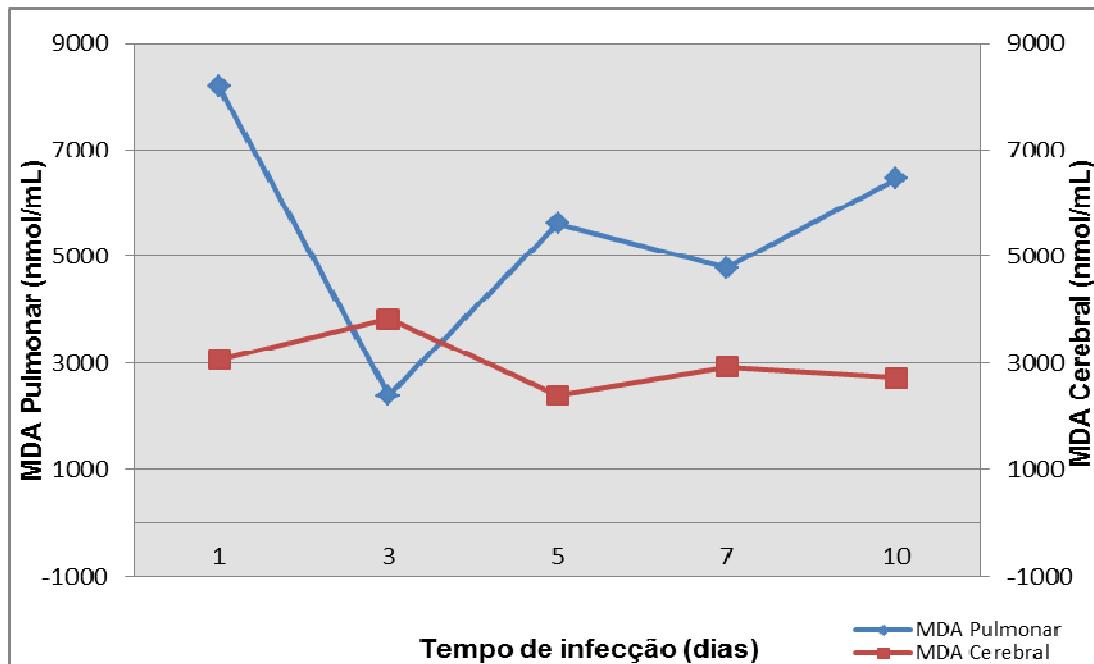


Figura 52: Comportamento do Malondialdeido (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com N-acetilcisteína.

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

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

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

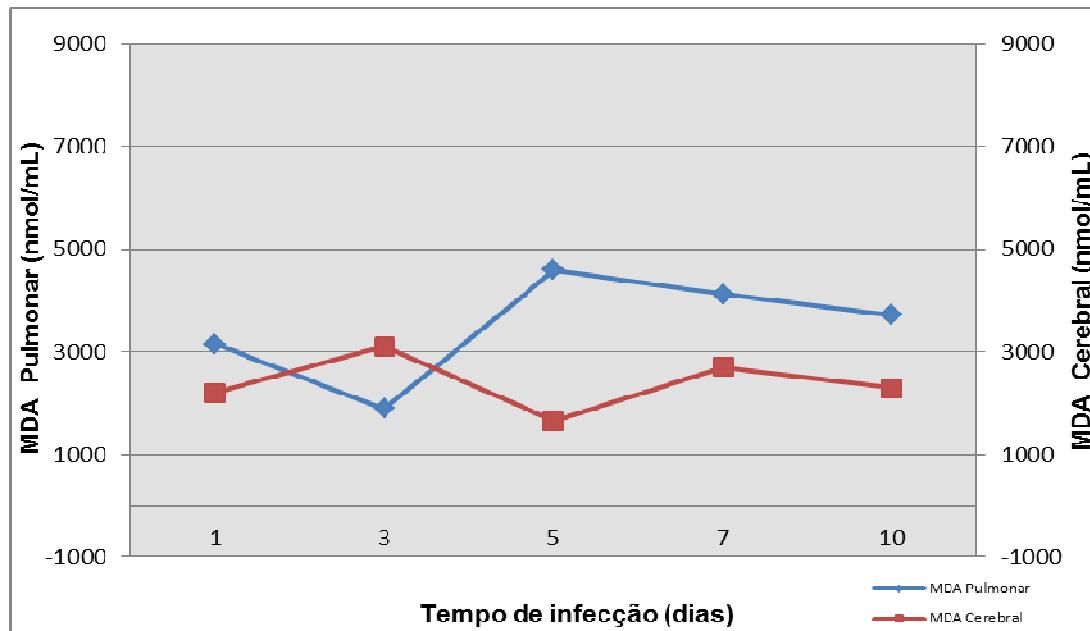


Figura 53: Comportamento do Malondialdeido (MDA) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com *Agaricus sylvaticus*.

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

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

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

5.3.5.3- Correlação entre NO Pulmonar e Cerebral

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

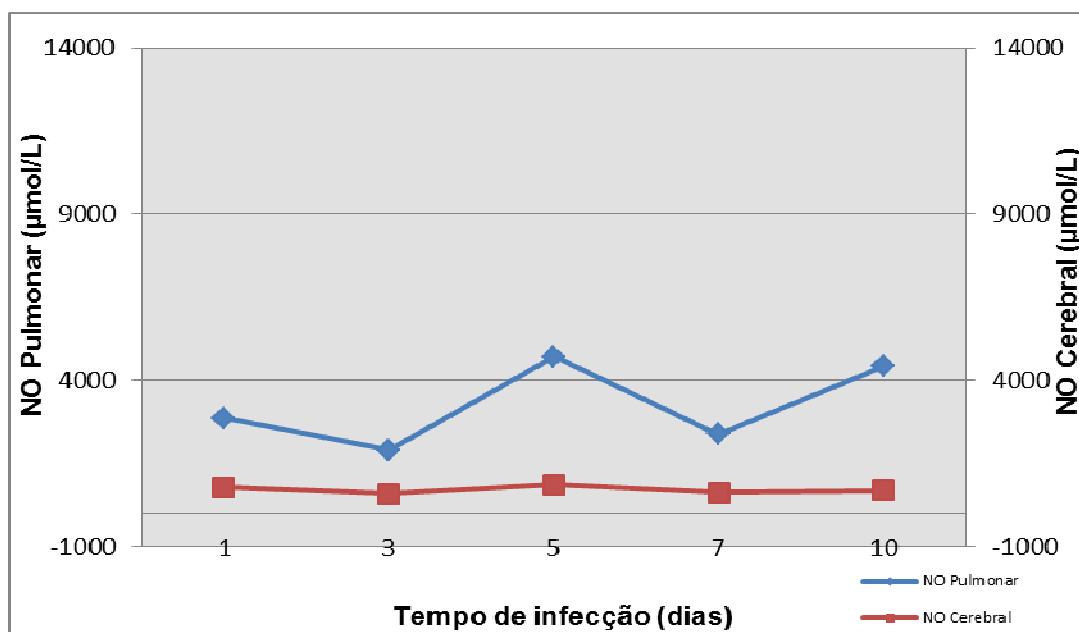


Figura 54: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle positivo.

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

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

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

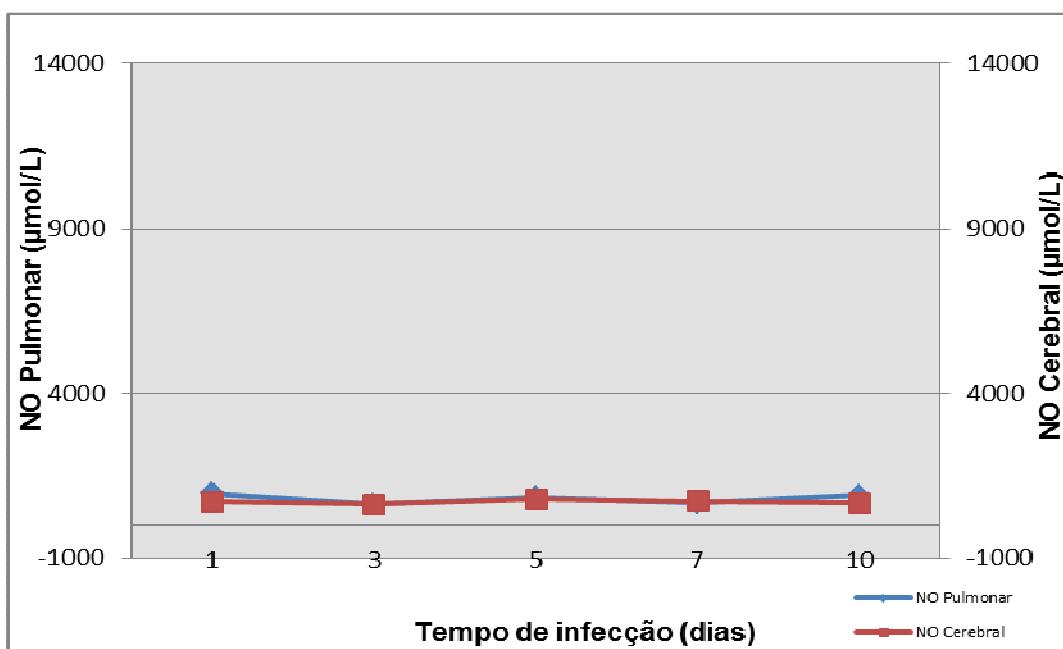


Figura 55: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo controle negativo.

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

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

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

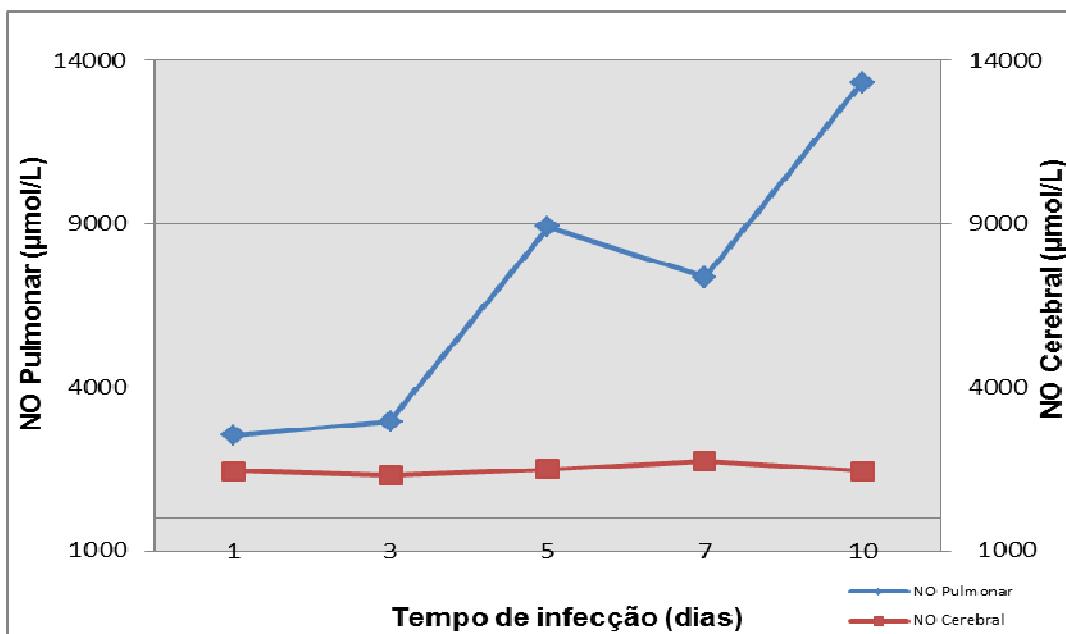


Figura 56: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com N-acetilcisteina.

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

Dias de Infecção	NO ($\mu\text{mol/L}$)		p valor*
	PULMÃO	CÉREBRO	
1	2517 \pm 2473	1443 \pm 480	0,1942
3	2955 \pm 1812	1304 \pm 287	0,0162
5	8906 \pm 3963	1501 \pm 248	1,696 \times 10 $^{-5}$
7	7369 \pm 1501	1741 \pm 494	7,424 \times 10 $^{-7}$
10	13340 \pm 8980	1429 \pm 95	0,0165

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

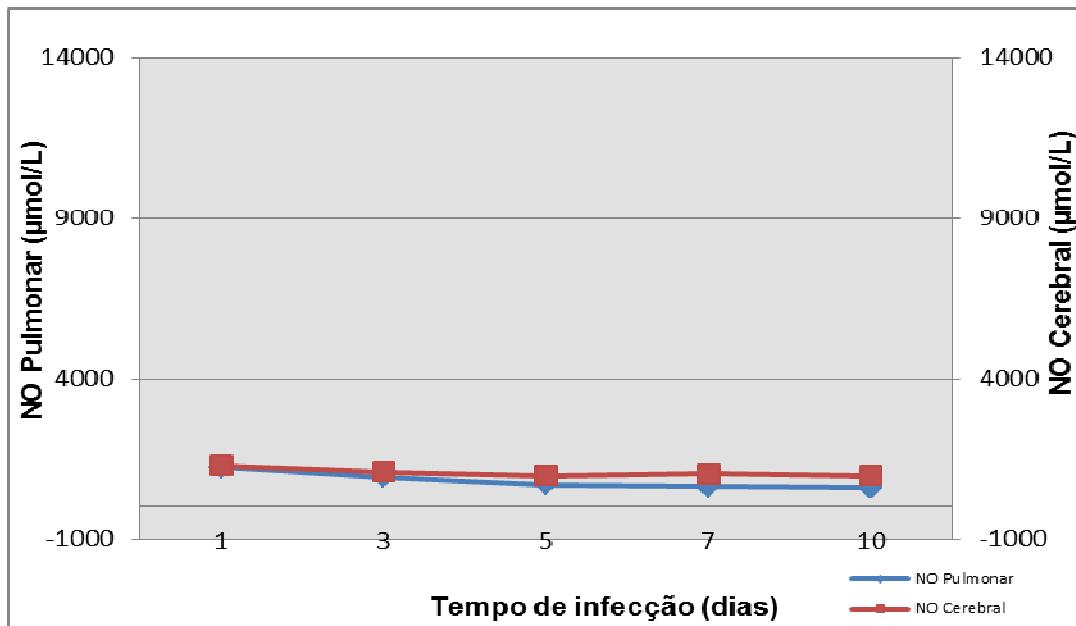


Figura 57: Comportamento do Óxido Nítrico (NO) entre Pulmão e Cérebro no grupo suplementado com *Agaricus sylvaticus*.

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

Dias de Infecção	NO ($\mu\text{mol/L}$)		<i>p</i> valor*
	PULMÃO	CÉREBRO	
1	1236±492	1289±154	0,7495
3	973±423	1095±55	0,4347
5	732±372	977±67	0,1402
7	648±158	1032±176	0,0007
10	608±173	982±130	0,0091

* t Student TEAC cerebral x TEAC pulmonar.

6- DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

6.1- COMPORTAMENTO OXIDATIVO PULMONAR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

aumento estatisticamente significativo nos níveis de NO ($p=0,0783$; tab. 4), podendo indicar que outra molécula pró-oxidante seja responsável pelo estresse oxidativo gerado, como por exemplo, a formação do radical ONOO[•] a partir da reação entre o NO e o O₂[•], provavelmente produzido por intensificação do processo inflamatório ou por fenômeno de isquemia e reperfusão, como resultado da citoaderência das hemárias parasitadas ao endotélio dos capilares pulmonares. Outra possibilidade seria uma depleção nos níveis de NO devido a hemólise intravascular, que levaria também a hipertensão pulmonar, como tem sido estudado por Janka *et al.* (2010).

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

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

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

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

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

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

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

6.1.1- Correlação Pulmonar e a Suplementação com Antioxidantes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.2- COMPORTAMENTO OXIDATIVO CEREBRAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.2.1- Correlação Cerebral e a Suplementação com Antioxidantes

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

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

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

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

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

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

6.3- ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS COMPORTAMENTOS OXIDATIVOS PULMONAR E CEREBRAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

7- CONCLUSÕES

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

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

8– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Taylor, W.R.; White, N.J. Malaria and the lung. *Clin. Chest Med.* 23, 457–468, 2002.
- Taylor, W.R.; Canon, V.; White, N.J. Pulmonary manifestations of malaria: recognition and anagement. *Treat Respir Med.* 5(6):419-428, 2006.
- Toler, S. The plasmodial apicoplast was retained under evolutionary selective pressure to assuage of blood stage oxidative stress. *Med Hypotheses*, 65(4): 683-690, 2005.
- Treeprasertsuk, S.; Krudsood, S.; Tosukhowong, T. N-acetylcysteine in severe falciparum malaria in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*;34:37–42, 2003.
- Trivedi, V.; Chand, P.; Srivastava, K.; Puri, S.K.; Maulik, P.R.; Bandyopadhyay, U. Clotrimazole Inhibits Hemoperoxidase of *Plasmodium falciparum* and Induces Oxidative Stress. *J Journal of Biolog Chem*, 280(50): 41129–41136, 2005.
- Van den Steen, P.E.; Geurts, N.; Deroost, K.; Van Aelst, I.; Verhenne, S.; Heremans, H.; Van Damme, J.; Opdenakker, G. Immunopathology and Dexamethasone Therapy in a New Model for Malaria-associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 181: 957–968, 2010.
- Wasser, S.P.; Didukh, M.Y.; Amazonas, M.A; Nevo, E.; Stamets, P.; Eira, A.F. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake Mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4: 267-290, 2002.
- Wasser, S.P.; Weis, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*, 19: 65-96, 1999.
- Watt, G.; Jongsakul, K.; Ruangvirayuth, R. A Pilot Study of N-Acetylcysteine as Adjunctive Therapy for Severe Malaria. *Q j med*, 295: 285-290, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

9- APÊNDICES

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

Animal	Controle Negativo		Controle Positivo		N-acetilcisteina		<i>Agaricus sylvaticus</i>	
	TEAC (P)	TEAC (C)	TEAC (P)	TEAC (C)	TEAC (P)	TEAC (C)	TEAC (P)	TEAC (C)
1	4,90	9,21	5,76	8,19	21,36	14,99	26,62	13,92
2	4,55	8,17	4,56	9,13	18,04	17,41	22,14	17,68*
3	5,52	9,59	4,63	7,50	18,20	14,54	22,61	12,76
4	5,31	8,97	5,76	7,72	22,56	15,34	24,15	15,5
5	3,98	8,85	9,26*	11,79	7,81	16,95	25,68	16,02
6	5,19	8,62	2,89*	9,46	13,32	16,92	19,86	14,99
7	5,37	7,98	5,60	7,35	11,91	15,5	24,32	14,76
8	4,0	7,63	†	†	13,63	13,44	14,98*	14,48
9	5,22	9,15	†	†	†	†	†	†
10	4,45	10,13	†	†	†	†	†	†
X±SD	4,85±0,57	8,83±0,76	5,26±0,61	8,73±1,57	15,85±5,03	15,63±1,36	23,63±2,28	14,63±1,07

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

Q1	4,47	8,28	4,63	7,61	12,96	14,88	22,37	14,20
Q3	5,29	9,19	5,76	9,29	18,99	16,93	25,00	15,24
DJ	0,81	0,91	1,13	1,68	6,02	2,05	2,62	1,04
3/2DJ	1,22	1,37	1,69	2,53	9,03	3,07	3,94	1,57
Q1-3/2DJ	3,26	6,91	2,94	5,08	3,93	11,80	18,44	12,63
Q3+3/2DJ	6,51	10,56	7,45	11,82	28,02	20,00	28,94	16,81
Min.	3,98	7,63	4,56	7,35	7,81	13,44	19,86	12,76
Max.	5,37	10,13	5,76	11,79	22,56	17,41	26,62	16,02

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

Animal	Controle Negativo		Controle Positivo		N-acetilcisteina		<i>Agaricus sylvaticus</i>	
	MDA (P)	MDA (C)	MDA (P)	MDA (C)	MDA (P)	MDA (C)	MDA (P)	MDA (C)
1	1241,34	1206,86	986,600	3100,17	12825,89	4015,83	1973,21	2020,99
2	1173,92	2717,23	627,84	3119,79	6457,79	4022,37	3677,73	2282,61
3	1167,75	2216,42	1345,37	4892,25*	10045,45	3937,34	1345,37	2321,86
4	1372,85	3094,78	3497,97	3714,97	3318,58	3401,03	4215,5	2204,13
5	1551,06	1173,88	2152,60	3100,17	7534,09	3773,83	6277,6	1935,97
6	1176,67	911,19	1614,45	2694,66	7803,16	4048,53	16772,32*	2119,10
7	1239,07	3652,98	986,61	2524,61	6009,33	1425,82	1076,29	2138,72
8	864,51	856,29	1973,21	791,39*	3587,66	3028,22	2421,67	2367,64
9	1337,12	1789,55	2959,82	1033,39*	25562,10*	2164,89	2421,67	2459,21
10	1684,79	952,24	4484,58	2799,31	16054,79	784,85	14978,49*	856,80*
X±SD	1282,5±132,6	1857,1±1013,0	2062,9±1239,9	3007,7±388,3	8181,9±4183,8	3060,3±1195,4	2926,1±1723,7	2205,6±169,1

* = Pontos excluidos; †= animais falecidos.

Q1	1175,98	1007,65	1076,30	388,30675	6009,33	2380,72	1816,25	2119,10
Q3	1346,05	2592,02	2758,02	2746,985	10045,45	3996,21	3812,17	2321,86
DJ	170,07	1584,37	1681,72	3109,98	4036,12	1615,49	1995,92	202,75
3/2DJ	255,10	2376,56	2522,58	362,995	6054,18	2423,23	2993,88	304,13
Q1-3/2DJ	920,88	-1368,91	-1446,28	544,4925	-44,85	-42,51	-1177,63	1814,97
Q3+3/2DJ	1601,16	4968,59	5280,59	2202,4925	16099,63	6419,44	6806,06	2625,99
Min.	1167,75	856,29	627,84	2524,61	3318,58	784,85	1076,29	1935,97
Max.	1551,06	3652,98	4484,58	3119,79	12825,89	4048,53	6277,60	2459,21

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

* = Pontos excluídos; †= animais falecidos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Animal	Controle Negativo		Controle Positivo		N-acetilcisteina		<i>Agaricus sylvaticus</i>	
	NO (P)	NO (C)	NO (P)	NO (C)	NO (P)	NO (C)	NO (P)	NO (C)
1	731,26	665,03	2826,48	483,24	3962,16	1304,86	406,66	1056,21
2	576,74	815,19	3239,45	791,35	18725,94	1391,35	734,44	877,83
3	1374,03	622,8	2000,54	429,19	4375,13	1564,32	440	867,03
4	826,65	672,07	4065,4	694,05	7678,91	1418,38	673,33	1126,48
5	1088,37	862,15	5407,56	488,64	22132,97	1856,22*	784,44	1661,62*
6	374,43	467,91	7369,18	1153,51	23165,4	1467,03	†	†
7	993,23	425,66	6027,02	748,11	†	†	†	†
8	1195,54	636,87	†	†	†	†	†	†
9	993,23	900,88	†	†	†	†	†	†
10	SD	SD	†	†	†	†	†	†
X\pmSD	905,9\pm312,1	674,3\pm163,9	4419,4\pm1922,1	684,0\pm251,5	13340,1\pm8980,2	1429,2\pm95,8	607,8\pm173,3	981,9\pm129,7

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

Q1	731,26	622,8	3032,96	485,94	5201,07	1391,35	440,0	875,13
Q3	1088,37	815,19	5717,29	769,73	21281,21	1467,03	734,44	1073,78
DJ	357,11	192,39	2684,32	283,79	16080,14	75,68	294,44	198,65
3/2DJ	535,66	288,58	4026,49	425,68	24120,21	113,52	441,66	297,97
Q1-3/2DJ	195,59	334,21	-993,52	60,25	-18919,13	1277,83	-1,66	577,16
Q3+3/2DJ	1624,03	1103,77	9743,78	1195,41	45401,42	1580,55	1176,1	1371,75
Min.	576,74	425,66	2000,54	429,19	3962,16	1304,86	406,66	867,03
Max.	1374,03	900,88	7369,18	1153,51	23165,4	1467,03	784,44	1126,48

10- ANEXOS

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO



PARECER MED014/2008

Projeto: ALTERAÇÕES OXIDATIVAS, DO ÓXIDO NÍTRICO E EXPRESSÃO DE CITOCINAS E GM-CSF, INDUZIDAS PELO *PLASMODIUM BERGHEI* EM CAMUNDONGOS.

Coordenador: Sandro Percário (NMT/UFPA)

Vigência: 06-03-2008 a 06-03-2011

O Projeto de Pesquisa intitulado “**ALTERAÇÕES OXIDATIVAS, DO ÓXIDO NÍTRICO E EXPRESSÃO DE CITOCINAS E GM-CSF, INDUZIDAS PELO *PLASMODIUM BERGHEI* EM CAMUNDONGOS**” foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) e os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para manipulação e uso de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das suas atribuições, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora deste período devem receber nova autorização deste comitê. Ao CEPAE é facultado o direito de verificar *in loco* a correta aplicação do protocolo aprovado.

A blue ink signature of a man's name, appearing to begin with 'Antônio'.

**Prof. Dr. Antônio Pereira
Presidente do CEPAE/UFPA**

ANEXO B - COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO COGUMELO *Agaricus sylvaticus*.

Substância	Concentração
Proteínas	39.4mg/100g
Gorduras	3.0g/100g
Carboidratos	45.6g/100g
Sódio	4.2mg/100g
Ferro	21.2mg/100g
Cálcio	35.7mg/100g
Potássio	3.15g/100g
Magnésio	100mg/100g
Cobre	8.24mg/100g
Zinco	6.61mg/100g
Manganês	0.65mg/100g
Selênio	36µg/100g
Tiamina (B1)	1.21mg/100g
Riboflavina (B2)	3.41mg/100g
Vitamina B6	0.83mg/100g
Vitamina B12	0.17µg/100g
Vitamina C	56mg/100g
Calciferol	5.8µg/100g
Ácido fólico	0.36mg/100g
Ácido pantotênico	39.4mg/100g
Inositol	201mg/100g
Niacina	39.9mg/100g
Arginina	1.71g/100g
Lisina	1.55g/100g
Histidina	0.62g/100g
Fenilalanina	1.11g/100g
Tirosina	0.83g/100g
Leucina	1.72g/100g
Isoleucina	1.10g/100g
Metionina	0.39g/100g
Valina	1.28g/100g
Alanina	1.75g/100g
Glicina	1.25g/100g
Prolina	1.26g/100g
Ácido Glutâmico	5.73g/100g
Serina	1.20g/100g
Treonina	1.21g/100g
Ácido aspártico	2.35g/100g
Triptofano	0.43g/100g
Cistina	0.36g/100g
Açúcar Livre	282mg/g
Fenóis	0.10mg/g
Beta D Glucana	126.98mg/g
Isoflavona (Genisteina)	0,875mg/g

Fonte: Laudo de análise fornecido pela empresa Cogumelo do Sol Agaricus do Brasil Com. Imp. & Exp. LTDA.