

# Avaliação do efeito de suplementos antioxidantes sobre o estresse oxidativo cerebral e pulmonar e na sobrevivência de camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei*\*

*Evaluation of the effect of antioxidant supplements on brain and lung oxidative stress and on the survival of Plasmodium berghei-infected mice*

Laura Vianna Warwick<sup>1</sup>, Danilo Moreira<sup>1</sup>, Rafael Quadros Gomes<sup>1</sup>, Eliete Pereira de Carvalho<sup>1</sup>, Sandro Percário<sup>1</sup>

\*Recebido da Universidade Federal do Pará. Belém, PA, Brasil.

## RESUMO

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** Mecanismos patogênicos desencadeados pelo *Plasmodium berghei* sugerem que suplementação prévia com antioxidantes possa exercer papel preventivo ao estabelecimento da malária. O objetivo deste estudo foi estudar os efeitos de suplementos antioxidantes sobre o estresse oxidativo cerebral e pulmonar e sobre a sobrevivência de camundongos infectados. **MÉTODOS:** Estudo experimental que utilizou camundongos divididos em 3 grupos de 10 animais cada. O grupo I correspondeu ao grupo controle positivo, o grupo II foi formado por animais tratados com N-acetilcisteína e o grupo III com *Agaricus sylvaticus*. Observou-se a sobrevivência e coletaram-se amostras de tecido pulmonar e cerebral no dia de óbito de cada animal. Avaliou-se a parasitemia, os níveis de malondialdeído e a capacidade antioxidante equivalente ao trolox. **RESULTADOS:** Não se encontrou relação significativa entre a administração prévia de *Agaricus sylvaticus* e N-acetilcisteína e o tempo de sobrevivência ou sobre a parasitemia dos animais infectados. Entretanto, níveis de malondialdeído no cérebro dos animais do grupo controle foram significativamente maiores ( $p < 0,0001$ ) que do N-acetilcisteína e *Agaricus sylvaticus*, sendo os valores do N-acetilcisteína menores que do *Agaricus sylvaticus*. Para capacidade antioxidante equivalente ao trolox cerebral, o grupo N-acetilcisteína apresentou valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que o *Agaricus sylvaticus*. Encontrou-se moderada correlação negativa ( $r = -0,73$ ;  $p = 0,02$ ) entre malondialdeído cerebral e sobrevivência. **CONCLUSÃO:** Estes dados sugerem que, apesar do nível de estresse oxidativo apresentar correlação negativa com

a sobrevivência dos animais, o uso de suplementos antioxidantes não promoveu aumento na expectativa de vida dos animais suplementados. Isto pode ter decorrido das doses utilizadas de antioxidantes ou das substâncias empregadas.

**Descritores:** *Agaricus sylvaticus*; Malária; N-acetilcisteína; Antioxidantes; Estresse oxidativo; Camundongos.

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Pathogenic mechanisms triggered by *Plasmodium berghei* suggest that prior supplementation with antioxidants may have a preventive role in the onset of malaria. The objective of this study was to study the effects of antioxidant supplements on brain and pulmonary oxidative stress and on the survival of infected mice. **METHODS:** An experimental study using mice, which were divided into 3 groups of 10 animals each. Group I corresponded to the positive control group, group II was formed by animals treated with N-acetylcysteine and group III with *Agaricus sylvaticus*. Survival was observed and samples of lung and brain tissues were collected on the day of death of each animal. Parasitemia, the levels of malondialdehyde, and antioxidant capacity equivalent to trolox were evaluated. **RESULTS:** There was no significant relationship between prior administration of *Agaricus sylvaticus* or N-acetylcysteine and the survival or parasitemia of infected animals. However, levels of malondialdehyde in the brain of animals from control group were significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than those of N-acetylcysteine and *Agaricus sylvaticus*, and values from of N-acetylcysteine were lower than of *Agaricus sylvaticus*. For brain antioxidant capacity equivalent to trolox, N-acetylcysteine group showed significantly higher values ( $p < 0.05$ ) than *Agaricus sylvaticus*. A mild negative correlation ( $p = 0.02$  and  $R = -0.73$ ) between brain malondialdehyde and survival was found. **CONCLUSION:** These data suggest that, although the levels of oxidative stress presented negative correlation with animals survival, the use of antioxidant supplements did not provide an increase in life expectancy of supplemented animals. This may have occurred due to the doses of antioxidants or of substances used.

**Keywords:** *Agaricus sylvaticus*; Malaria; N-acetylcysteine; Antioxidants; Oxidative stress; Mice.

1. Universidade Federal do Pará. Belém, PA, Brasil.

Apresentado em 14 de janeiro de 2013.

Aceito para publicação em 05 de julho de 2013.

Conflito de interesses: Nenhum.

### Endereço para correspondência:

Prof. Sandro Percário

Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Av. Augusto Correa, 1 – Guamá

66075-110 Belém, PA, Brasil.

E-mail: percario@ufpa.br

## INTRODUÇÃO

A malária representa um grave problema de saúde pública no mundo, com cerca de 40% da população exposta ao risco de contrair a doença em mais de 100 países. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que haja cerca de 300 a 500 milhões de novos casos e cerca de um milhão de mortes por ano. No Brasil, a doença apresenta elevado risco de transmissão na região da Amazônia Legal, com incidência bastante elevada (IPA 15,9/1.000)<sup>(1)</sup>.

A elevada mortalidade da doença decorre da falta de conhecimento dos complexos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na doença, à despeito dos extensos esforços no estudo desta antiga doença. Entretanto, modernamente discute-se o envolvimento dos radicais livres, através do estresse oxidativo, na fisiopatogenia da malária<sup>(2-9)</sup>. Também se discute o papel do óxido nítrico (NO)<sup>(10,11)</sup> e das defesas antioxidantes<sup>(12-14)</sup> nestes processos.

De fato, a infecção pelo *Plasmodium berghei* (PB) envolve diversas vias de regulação redox em diferentes estágios evolutivos do parasita. Nesse sentido, parece haver correlação entre estas vias e os mecanismos patogênicos desencadeados ou induzidos pelo parasita na célula hospedeira. Tais mecanismos têm como base a produção de radicais livres e defesas antioxidantes nas células hospedeiras, integradas à expressão de citocinas diversas com o intuito de debelar a infecção<sup>(2-14)</sup>. Contudo, a relação entre o estado redox do parasita e das células hospedeiras é muito complexa, inclusive envolvendo a produção de NO<sup>(10,11)</sup>.

Por outro lado, fármacos antimaláricos também são indutores de estresse oxidativo, tais como a cloroquina e a artemisinina<sup>(14-16)</sup>, o que torna o panorama redox nesta doença bastante complexo e intrincado.

Adicionalmente, os plasmódios são altamente suscetíveis a alterações no equilíbrio redox, as quais podem contribuir para manifestações da doença, tal como a malária cerebral<sup>(10)</sup>, bem como as alterações oxidativas em eritrócitos infectados com *P. falciparum* parecem estar associadas ao envelhecimento acelerado destas células e contribuir para o desenvolvimento da anemia apresentada por estes indivíduos<sup>(11)</sup>. O desenvolvimento da anemia pode promover alterações da fisiologia circulatória, levando a existência de momentos alternados de hipóxia com manutenção da oxigenação tecidual em níveis basais, favorecendo a participação da síndrome de isquemia e reperfusão, responsável pela produção adicional de radicais livres<sup>(17)</sup>.

Por outro lado, para se proteger da agressão oferecida pelo estresse oxidativo intraeritrocitário, o parasita possui uma organela capaz de produzir o antioxidante ácido alfa lipóico. Esta organela, o apicoplasto, foi provavelmente incorporada ao parasita como adaptação evolutiva, uma vez que também está presente como simbionte em algas vermelhas<sup>(18)</sup>. Outras moléculas antioxidantes são produzidas pelo parasita e incluem a glutatona (GSH)<sup>(14)</sup>, a vitamina B6<sup>(19)</sup>, as enzimas superóxido dismutase e outras<sup>(20)</sup>.

Adicionalmente, a expressão de citocinas pela hemozoína, um metabólito do parasita liberado durante a esquizogonia, parece ser dependente da produção de radicais livres e pode ser inibida pela adição da enzima antioxidante superóxido dismutase<sup>(20)</sup>.

Segundo alguns autores o potencial antioxidante dos cogumelos do gênero *Agaricus* pode interferir na sobrevivência do hospedeiro

infectado pelo *Plasmodium*. Sabe-se que muitos dos constituintes presentes no *Agaricus sylvaticus* (AS) possuem atividades antioxidantes, como por exemplo, isoflavona, riboflavina, dentre muitos outros<sup>(21,22)</sup>. Como ocorre esse processo e quais fatores interferem nas alterações oxidativas do hospedeiro ainda encontra-se em fase de investigação<sup>(23,24)</sup>.

Diante do papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da doença, a suplementação prévia com fontes ricas em antioxidantes apresenta potencial para prevenção do estabelecimento da doença e, dentre o universo de antioxidantes existentes, dois são particularmente interessantes: a N-acetilcisteína (NAC), única substância exógena indutora de síntese endógena de glutatona reduzida conhecida até o momento<sup>(12)</sup> e os cogumelos do gênero *Agaricus*, identificados como portadores de elevada capacidade antioxidante total<sup>(24)</sup>.

Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito da administração prévia de suplementação nutricional antioxidante com *Agaricus sylvaticus* ou N-acetilcisteína na evolução da malária e sobre o tempo de sobrevivência de camundongos infectados pelo PB e verificar a existência de correlação entre o estresse oxidativo pulmonar e cerebral com a parasitemia dos animais.

## MÉTODOS

Estudo do tipo experimental realizado entre janeiro e agosto de 2011. Foram utilizados 30 camundongos (*Mus musculus*) machos da raça Swiss, adultos jovens, procedentes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém/PA. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, que foram acompanhados diariamente para observação da sobrevivência, sendo realizadas coletas de amostras de sangue, tecido pulmonar e cerebral no dia relatado como de óbito de cada animal para realização da parasitemia, bem como para dosagem de marcadores de estresse oxidativo e da defesa antioxidante. Os grupos foram constituídos em Grupo I - Grupo controle - GC (n=10): corresponde ao grupo positivo constituído por animais que foram infectados pelo *P. berghei*; Grupo II - NAC (n=10): animais infectados pelo *P. berghei* e tratados com NAC; Grupo III - AS (n=10): animais infectados pelo *P. berghei* e tratados com *Agaricus sylvaticus*.

Os camundongos foram induzidos à malária pela inoculação intraperitoneal de 10<sup>(7)</sup> hemácias infectadas pelo PB, diluídas em 0,2mL de solução salina estéril. A cepa de PB foi fornecida pelo Laboratório de Neuroquímica da Universidade Federal do Pará. Após a inoculação das hemácias infectadas nos animais dos três grupos, estes foram acondicionados em gaiolas individuais para roedores e mantidos com ração e água *ad libitum*.

Os animais do grupo NAC foram pré-tratados com os antioxidantes NAC, em forma de solução aquosa a 5%, na dose de 0,4mL/kg de peso corporal do animal, ou *Agaricus sylvaticus* (grupo AS), em forma de solução aquosa a 1%, na dosagem de 0,2mL/kg de peso corporal. Os suplementos foram administrados por gavagem 24h antes e a cada 24h, após a infecção pelos plasmódios, até o dia de óbito.

Homogeneizado de tecidos: após a retirada de fragmento do tecido para realização de exame anatomopatológico, a massa pulmonar e cerebral restante retirada dos animais foi pesada e acrescida de solução tampão salina fosfato PBS na proporção 1:10 (m:m).

Na sequência, dentro do copo béquer em que foram pesados, o pulmão e o cérebro foram picotados com tesoura de ponta fina para produzir fragmentos menores, com a finalidade de facilitar a sua homogeneização. O processo de homogeneização foi realizado em um disruptor de células ultrassônico (Thornton, D. Cel), por um tempo de quatro minutos após a sintonização da agulha de homogeneização, estando o aparelho selecionado na potência de 10 W. Durante o processo de homogeneização o copo béquer contendo o material foi mantido dentro de gelo picado para evitar que o calor produzido no processo comprometesse a viabilidade das amostras.

O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical Co 23881-3), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio – Sigma A1888) com persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), produzindo diretamente o radical cátion ABTS<sup>•+</sup>, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm 21-22. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorvância lida a 734nm durante um determinado intervalo de tempo. Assim, a extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion ABTS<sup>•+</sup> é determinada como a atividade antioxidante total da amostra, sendo então calculada a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições. Os resultados finais foram expressos em micromoles por litro (µM/L) correspondente à concentração do trolox com capacidade antioxidante equivalente à da amostra testada, padrão de medida este denominado TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)<sup>(25,26)</sup>.

### Dosagem do malondialdeído (MDA)

Baseia-se na reação de duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de MDA, formando um complexo TBA-MDA-TBA de cor rósea, com absorvância em 535 nm<sup>(27-28)</sup>. Com o propósito de verificar a parasitemia, foi realizado um esfregaço sanguíneo, corado pelos métodos de Giemsa e May-Grünwald, 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.

### Análise estatística

Para cada parâmetro analisado foi realizado o teste de Variância Múltipla, através do uso do *software* Bioestat 5.0 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Belém – PA, Brasil). Quando se identificou a existência de diferenças significativas, estas foram exploradas em comparação pareada 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 uma suspeita de relação linear, se fez uma 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<0,05).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais de experimentação da Universidade Federal do Pará, segundo Parecer MED 014/2008.

### RESULTADOS

Quanto à investigação da relação entre a administração prévia de suplementação nutricional antioxidante com AS ou NAC e o tempo de sobrevivência dos animais infectados, o teste ANOVA (p=0,5021) indica que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de sobrevivência dos grupos de animais estudados. Estes dados estão apresentados na tabela 1.

Em relação à análise do estresse oxidativo pulmonar e cerebral dos camundongos, encontrou-se diferença significativa para análise de MDA no cérebro entre os grupos (p<0,0001), sendo os valores dos dois grupos suplementados menores que o GC. Esses dados foram explorados pelo teste de Tukey, ocorrendo significância entre GC e NAC (p<0,01), entre GC e AS (p<0,05) e entre NAC e AS (p<0,05).

Para o TEAC cerebral também houve significância estatística entre o AS e o GC (p=0,0409), bem como o AS apresentou valores estatisticamente menores que o NAC, com p<0,05 entre o NAC e o AS. Não foi encontrada significância na análise entre os grupos para o MDA e TEAC pulmonar, nem na parasitemia e sobrevivência dos grupos estudados.

Na investigação de possível correlação entre parâmetros através do teste de Pearson, não se encontraram correlações significativas, exceto moderada correlação positiva entre TEAC e sobrevivência para amostras pulmonares, quando se consideraram todos os animais (Figura 1; R=0,4540; p=0,0193), correlação negativa entre

Tabela 1 – Valores de Malondialdeído, capacidade antioxidante equivalente ao trolox, parasitemia e sobrevivência dos grupos estudados

Grupos	n	MDA (ng/mL)		TEAC (mmol/L)		Parasitemia (%)	Sobrevivência (dias)
		Cérebro	Pulmão	Cérebro	Pulmão		
GC	10	36956 ± 7034	6878 ± 4599	12,02 ± 2,77	18,29 ± 4,50	32,0 ± 18,2	10,1 ± 4,95
NAC	9	21255 ± 4669**	5092 ± 1647	13,36 ± 0,93	21,04 ± 3,50	32,4 ± 13,2	11,33 ± 4,58
AS	10	28673 ± 5880**	6769 ± 4039	11,48 ± 2,05#	17,76 ± 4,33	28,6 ± 11,3	8,7 ± 4,83

MDA = malondialdeído; TEAC = capacidade antioxidante equivalente ao trolox; GC = grupo controle; NAC = animais tratados com N-acetilcisteína; AS = animais tratados com *Agaricus sylvaticus*.

\*= p<0,05 versus GC; \*\* =p<0,01 versus GC; # =p<0,05 versus NAC; =p<0,05 versus NAC.

MDA e sobrevivência para amostras cerebrais, quando se consideraram todos os animais ( $R=-0,3862$ ;  $p=0,0393$ ), além de forte correlação positiva entre MDA e parasitemia para amostras pulmonares, quando se consideraram só os animais do AS ( $R=0,8182$ ;  $p=0,0028$ ).

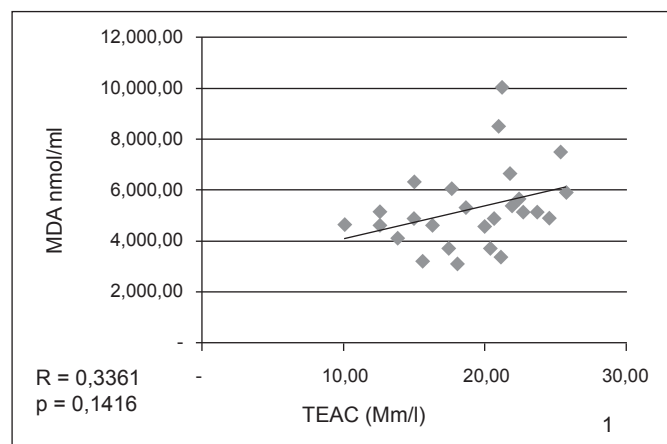


Figura 1 – Correlação entre a capacidade antioxidante equivalente ao trolox e sobrevivência em amostras pulmonares de camundongos, considerando todos os animais dos 3 grupos simultaneamente  
TEAC = capacidade antioxidante equivalente ao trolox; MDA = malondialdeído.

## DISCUSSÃO

Os mecanismos do envolvimento de antioxidantes e do estresse oxidativo na patogênese da malária em humanos ainda não estão claros. No entanto, tem se proposto que antioxidantes, tais como carotenoides ou vitamina E, poderiam fornecer proteção contra o estresse oxidativo induzido pela infecção do *Plasmodium*, modulando a resposta imune. Não obstante, a ação inibitória da NAC sobre a citoaderência de células vermelhas sanguíneas infectadas com *Plasmodium falciparum* também se deve a expressão de CD36 e dissolução de agregados pré-formados<sup>(12)</sup>.

A deformidade da população de eritrócitos infectados correlaciona-se diretamente com a gravidade da doença, o que compromete o fluxo da microcirculação sanguínea, parcialmente obstruído pela citoaderência das hemácias infectadas. Entretanto, suplementação com NAC ou outras moléculas antioxidantes atuam prevenindo e revertendo a deformidade induzida pelos produtos heme, bem como decorrentes das alterações oxidativas nos eritrócitos, promovendo dessa forma proteção ao hospedeiro e, desta forma, podendo estar relacionada a um maior tempo de sua sobrevivência.

Paralelamente, a despeito de se considerar a capacidade de induzir o estresse oxidativo como mecanismo de ação de fármacos antimaláricos, muito recentemente diversos extratos de plantas e outros produtos naturais tem sido testados em função de suas propriedades antioxidantes, assim, interferindo nos mecanismos da doença através de modulação da via de sinalização celular e não agindo diretamente sobre os parasitos, induzindo-lhes a morte. Esta abordagem tem apresentado resultados muito promissores, com taxas de atividade esquizotóxica e antiparasitárias elevadas, porém com menores alterações no balanço redox dos hospedeiros. Algumas das plantas testadas com este fim incluem folhas de *Piper betle* L.<sup>(29)</sup>,

*Anogeissus leiocarpus*<sup>(30)</sup>, sementes de *Nigella sativa*<sup>(31)</sup>, e flavonoides de *Artemisia annua* L.<sup>(32)</sup>. Também se sugere que frutos de cacau possam apresentar efeito malaricida<sup>(33)</sup>.

Adicionalmente, cogumelos *Agaricus sylvaticus*, que apresentam elevada capacidade antioxidante<sup>(24)</sup>, foram testados em camundongos infectados pelo *P. berghei* promovendo aumento da capacidade antioxidante total dos animais, bem como diminuição de marcadores da peroxidação lipídica e do óxido nítrico em amostras de pulmão e cérebro desses animais. Estas alterações bioquímicas foram correlacionadas à redução significativa da parasitemia dos animais<sup>(34,35)</sup>.

Nesse sentido, no presente estudo encontrou-se diferença significativa entre os grupos estudados para valores de MDA das amostras cerebrais, evidenciando a ocorrência do estresse oxidativo no cérebro dos animais infectados, sendo que o grupo NAC apresentou valores menores que o AS, o que pode significar uma possível melhor proteção da NAC sobre o estresse oxidativo do que o AS neste modelo experimental de malária. Para os valores de TEAC, que expressa o potencial antioxidante total da amostra, não foram encontradas diferenças entre os grupos, provavelmente decorrente do consumo de antioxidantes apresentados pelos animais em decorrência do estresse oxidativo. Entretanto, estes resultados sugerem que a administração de ambos os suplementos antioxidantes tenha promovido redução no estresse oxidativo decorrente da infecção pelo plasmódio nesses animais e possa se constituir em estratégia adjuvante no tratamento da doença.

Os valores de MDA e TEAC nas amostras pulmonares não mostraram qualquer relação significativa, o que pode significar a existência de vias bioquímicas redox diferentes no cérebro e no pulmão.

Encontrou-se boa correlação positiva entre MDA pulmonar e parasitemia no grupo AS, com valores significativos, o que indica que níveis elevados de estresse oxidativo são acompanhados de evolução menos favorável, com maior percentual de parasitemia. Entretanto, a despeito das alterações oxidativas observadas, o objetivo primário do presente estudo incluía a avaliação do efeito dos suplementos antioxidantes sobre a sobrevivência dos animais infectados pelo *P. berghei*. Encontrou-se também moderada correlação negativa entre MDA cerebral e sobrevivência no grupo NAC. Estes dados sugerem que, apesar dos níveis de estresse oxidativo se correlacionar negativamente com a sobrevivência dos animais, o uso de suplementos antioxidantes não promoveu aumento na expectativa de vida dos animais suplementados.

Poucos estudos disponíveis na literatura abordaram o efeito de suplementos antioxidantes em modelos da doença: Srivastava et al.<sup>(36)</sup> demonstraram que a suplementação combinada de queladores de metais e antioxidantes promovia a diminuição de marcadores do estresse oxidativo e o aumento da sobrevivência em *Mastomys coucha*. Levander et al.<sup>(37)</sup> administraram dietas deficientes em vitamina E a animais infectados por *P. yoelli*, verificando a diminuição da sobrevivência, o que era revertido pela adição de óleos de peixe, sugerindo que a manipulação do estado antioxidante do hospedeiro possa se converter em estratégia promissora de controle da doença.

Coletivamente, os dados do presente estudo sugerem que a administração de suplementos antioxidantes reverte as alterações oxidativas associadas à infecção pelos plasmódios e, portanto, poderíamos esperar algum reflexo sobre a expectativa de vida destes

animais. Entretanto, não se encontrou relação significativa entre a administração prévia de AS ou NAC e o tempo de sobrevivência ou sobre a parasitemia dos animais infectados.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que, embora diminuindo o estresse oxidativo, o uso destes antioxidantes não promova alterações na sobrevivência dos animais. Eventualmente, doses maiores desses suplementos possam promover esse efeito, entretanto, mais estudos são necessários para se verificar esta sugestão.

## AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos ao CNPq pela concessão de bolsa de Iniciação Científica ao primeiro autor, à UFPA pela infraestrutura utilizada durante o desenvolvimento do trabalho e aos pesquisadores do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Estresse Oxidativo da UFPA.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância epidemiológica. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM, 2003 [Internet]. Ministério da Saúde: Brasília (DF), 2003. [citado 2013 Jul 14]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pncm.pdf>
2. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.* 2005;157(3):175-88. Review.
3. Jaramillo M, Godbout M, Olivier M. Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2005;174(1):475-84.
4. Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol.* 2004;34(2):163-89. Review.
5. Dondorp AM, Omodeo-Salè F, Chotivanich K, Taramelli D, White NJ. Oxidative stress and rheology in severe malaria. *Redox Rep.* 2003;8(5):292-4. Review.
6. Omodeo-Salè F, Motti A, Basilico N, Parapini S, Olliaro P, Taramelli D. Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. *Blood.* 2003;102(2):705-11.
7. Pablón A, Carmona J, Burgos LC, Blair S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Biochem J.* 2002;368(Pt3):71-8.
8. Huber SM, Uhlemann AC, Gamper NL, Duranton C, Kremsner PG, Lang F. *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J.* 2002;21(1-2):22-30.
9. Yazar S, Kilic E, Saraymen R, Ozbilge H. Serum malondialdehyde levels in patients infected with *Plasmodium vivax*. *West Indian Med J.* 2004;53(3):147-9.
10. Gramaglia I, Sobolewski P, Meays D, Contreras R, Nolan JP, Frangos JA, et al. Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med.* 2006;12(12):1417-22.
11. Pino P, Taoufiq Z, Nitchou J, Vouldoukis I, Mazier D. Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost.* 2005;94(2):336-40. Review.
12. Scardoeli CAC. Modulação da N-acetilcisteína nas alterações pulmonares da malária provocadas pelo *Plasmodium berghei* em camundongos. [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1996.
13. Ittarat W, Sreepian A, Srisarin A, Pathephotivong K. Effect of dihydroartemisinin on the antioxidant capacity of *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2003;34(4):744-50.
14. Meierjohann S, Walter RD, Müller S. Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* 2002;368(Pt3):761-8.
15. Farombi EO, Shyntum YY, Emerole GO. Influence of chloroquine treatment and *Plasmodium falciparum* malaria infection on some enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense indices in humans. *Drug Chem Toxicol.* 2003;26(1):59-71.
16. Siddiqi NJ, Alhomida AS, Dutta GP, Pandey VC. Antagonist effect of chloroquine and tumor necrosis factor on hepatic oxidative stress and antioxidant defense in normal and *Plasmodium yoelii* nigeriensis-infected mice. *In Vivo.* 2002;16(1):67-70.
17. Percário S, Moreira DR, Gomes BA, Ferreira ME, Gonçalves AC, Laurindo PS, et al. Oxidative stress in malaria. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):16346-72.
18. Toler S. The plasmodial apicoplast was retained under evolutionary selective pressure to assuage blood stage oxidative stress. *Med Hypotheses.* 2005;65(4):683-90.
19. Wrenger C, Eschbach ML, Müller IB, Warnecke D, Walter RD. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2005;280(7):5242-8.
20. Müller S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 2004;53(5):1291-305. Review.
21. Liu F, Ooi VE, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* 1997;60(10):763-71.
22. Hirotsu M, Sai K, Hirotsu S, Yoshikawa T, Blazepirols B, C, E and F, des-A-ergostane-type compounds, from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. *Phytochemistry.* 2002;59(5):571-7.
23. Gennari JL, Veronesi R, Felipe Jr J, et al. Effect of *Agaricus sylvaticus* dietary supplementation on NK cell count in cancer patients. In: Romaine CP, Keil CB, Rinker DL, Royse DJ, editors. Science and cultivation of edible and medicinal fungi. Pennsylvania: Penn State; 2004. p. 633-5.
24. Percário S, Naufal AS, Gennari MS, Gennari JL. Antioxidant activity of edible blushing wood mushroom, *Agaricus sylvaticus* Schaeff. (Agaricomycetidae) in vitro. *Int J Med Mushr.* 2009;11(2):133-40.
25. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 1993;84(4):407-12.
26. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-7.
27. Kohn HI, Liversedge M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Experimen Ther.* 1944;82(3):292-300.
28. Percario S, Vital AC, Jablonka F. Dosagem do malondialdeído. *NewsLab.* 1994;6:46-50.
29. Al-Adhroey AH, Nor ZM, Al-Mekhlafi HM, Amran AA, Mahmud R. Antimalarial activity of methanolic leaf extract of *Piper betle* L. *Molecules.* 2010;16(1):107-18.

30. Akanbi OM, Omonkhua AA, Cyril-Olutayo CM, Fasimoye RY. The antiplasmodial activity of *Anogeissus leiocarpus* and its effect on oxidative stress and lipid profile in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Parasitol Res.* 2012;110(1):219-26.
31. Okeola VO, Adaramoye OA, Nneji CM, Falade CO, Farombi EO, Ademowo OG. Antimalarial and antioxidant activities of methanolic extract of *Nigella sativa* seeds (black cumin) in mice infected with *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Parasitol Res.* 2011;108(6):1507-12.
32. Ferreira JF, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules.* 2010;15(5):3135-70.
33. Addai FK. Natural cocoa as diet-mediated antimalarial prophylaxis. *Med Hypotheses.* 2010;74(5):825-30.
34. Gomes BAQ. Efeitos da suplementação com antioxidantes sobre as alterações oxidativas cerebrais e pulmonares em malária murina. [tese]. Belém: Universidade Federal do Para; 2011.
35. Silva LD. Efeito da suplementação com antioxidantes sobre as alterações oxidativas e produção de interferon gamma e fator de necrose tumoral alfa em tecido pulmonar de camundongos infectados por *Plasmodium berghei*. [tese] Belém: Universidade Federal do Para; 2011.
36. Srivastava PJ, Chandra S, Arif AJ, Singh C, Panday V. Metal chelators/antioxidants: approaches to protect erythrocytic oxidative stress injury during *Plasmodium berghei* infection in *Mastomys coucha*. *Pharmacol Res.* 1999;40(3):239-41.
37. Levander OA, Ager AL Jr, Morris VC, May RG. *Plasmodium yoelii*: comparative antimalarial activities of dietary fish oils and fish oil concentrates in vitamin E-deficient mice. *Exp Parasitol.* 1990;70(3):323-9.