

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Papel do extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* na infecção de camundongos  
C57BL/6 por *Plasmodium berghei* ANKA

Yusmaris Josefina Cariaco Sifontes

Uberlândia  
Fevereiro - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Papel do extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* na infecção de camundongos  
C57BL/6 por *Plasmodium berghei* ANKA

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas da Universidade  
Federal de Uberlândia como requisito  
parcial para obtenção do título de mestre

Yusmaris Josefina Cariaco Sifontes

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neide Maria da Silva

Uberlândia  
Fevereiro - 2017



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S573p  
2017      Sifontes, Yusmaris Josefina Cariaco, 1989  
            Papel do extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* na  
            infecção de camundongos C57BL/6 por *Plasmodium berghei* ANKA /  
            Yusmaris Josefina Cariaco Sifontes. - 2017.  
            64 p. : il.

            Orientadora: Neide Maria da Silva.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
            Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
            Inclui bibliografia.

            1. Imunologia - Teses. 2. Malária - Teses. 3. *Plasmodium* - Teses. 4.  
            *Trichoderma stromaticum* - Teses. I. Silva, Neide Maria da. II.  
            Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
            Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 612.07



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Yusmaris Josefina Cariaco Sifontes**

“Papel do extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* na infecção de camundongos C57BL/6 por *Plasmodium berghei* ANKA”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 15 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Gerhard Wunderlich – USP

Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva – ICBIM/UFU

Prof. Dra. Neide Maria da Silva (orientadora) – ICBIM/UFU

*Dedicado ao meu pai Antonio que sempre está nos meus sonhos*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Neide Maria Silva por me aceitar no seu Laboratório e por me orientar sábiamente durante este período da minha vida acadêmica, assim como me incentivar a melhorar cada dia.

À Prof<sup>a</sup>. Wânia Rezende Lima por ser um apoio fundamental na realização desta pesquisa, por me ensinar tantas coisas, pela paciência, pelos conselhos, pela amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Jane Lima dos Santos por gentilmente fornecer a cepa do fungo utilizada durante este trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Imunopatologia por me acolher no grupo, ser a minha segunda família e me auxiliar sempre durante os experimentos. Romulo, Layane, Marcos, Ester, Marisol, Natália, Mário, Loyane, Mayara, Nathália, Carlos, Angelo e Mariele. Vocês foram peças fundamentais no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos funcionários da área de Histologia, Ester, Fabrício, Juscélia, Mariani e Rosiane por me ajudar em tudo quanto precisei.

À Ana Claudia por sua assistência no processamento das amostras no citômetro, pelos valiosos conselhos e conforto em momentos difíceis.

Ao pessoal do Laboratório de Tripanosomatídeos pela inestimável ajuda prestada no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao pessoal Laboratório de Neurociências pelo auxílio no uso do microscópio de luz polarizada.

Aos professores e secretárias do PPIPA.

Aos meus colegas de aulas por sempre estarem preocupados do meu bem-estar na cidade e por fazer um esforço por me compreender durante as aulas no início da minha estância no Brasil.

A todas as pessoas que conheci em Uberlândia e que me ajudaram em tantos sentidos, cujos nomes não caberiam nestas páginas. Em especial Clarissa, Vinícius, Juliana e Fabíola que foram anjos durante meus primeiros dias no Brasil.

À minha família e amigos na Venezuela que sempre torcem pelo meu sucesso, em especial a minha mãe Leyda que está sempre no meu pensamento e coração. Saudade!

Ao Jesús por me apoiar e estar comigo sempre e em cada momento.

À Câmara de Comercio de Cumaná por me fornecer ajuda para chegar ao Brasil.

À OEA e a GCUB por ter me fornecido a oportunidade de vir estudar no Brasil.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

*"Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto"*

Carl Sagan

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros avaliados no escore RMCBS.....	25
<b>Tabela 2.</b> Sequências de <i>primers</i> usados para a amplificação dos genes por qPCR.....	29
<b>Tabela 3.</b> Análise do escore de morbidade referente à Figura 1, por meio do Pós-teste de Bonferroni.....	60
<b>Tabela 4.</b> Análise da variação do peso referente à Figura 1, por meio do Pós-teste de Bonferroni.....	61
<b>Tabela 5.</b> Análise de parasitemia referente à Figura 1, por meio do Pós-teste de Bonferroni.....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sobrevivência, morbidade, variação do peso e parasitemia de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA) e tratados ou não com diferentes concentrações de extrato etanólico bruto de <i>Trichoderma stromaticum</i> (Ext-Ts).....	31
<b>Figura 2.</b> Sobrevivência, morbidade, variação do peso e hematócrito de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA) e tratados ou não com 100 mg/kg/dia de extrato etanólico bruto de <i>Trichoderma stromaticum</i> (Ext-Ts).....	32
<b>Figura 3.</b> Parasitemia de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de <i>Trichoderma stromaticum</i> (Ext-Ts).....	34
<b>Figura 4.</b> Dosagem de lipídeos em soro de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de <i>Trichoderma stromaticum</i> (Ext-Ts).....	35
<b>Figura 5.</b> Avaliação histológica do fígado de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de <i>Trichoderma stromaticum</i> (Ext-Ts).....	36
<b>Figura 6.</b> Deposição de hemozoína no fígado e níveis de TGP séricos de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de <i>Trichoderma stromaticum</i> (Ext-Ts).....	37
<b>Figura 7.</b> Avaliação da histologia e do conteúdo de água nos pulmões de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de <i>Trichoderma stromaticum</i> (Ext-Ts).....	39
<b>Figura 8.</b> Avaliação histológica do cérebro de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de <i>Trichoderma stromaticum</i> (Ext-Ts).....	40
<b>Figura 9.</b> Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica e do conteúdo de água em cérebros de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de <i>Trichoderma stromaticum</i> (Ext-Ts).....	41
<b>Figura 10.</b> Expressão relativa de mRNA para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ , iNOS, ICAM-1 e VCAM-1 no cérebro.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

**H&E** – Hematoxilina e Eosina

**CD36** – Cluster of differentiation 36

**CD4** - Cluster of differentiation 4

**CD8** - Cluster of differentiation 8

×g - G-Force

**PBS** – Tampão fosfato salino

**GFP** – Green Fluorescent Protein

**DEPC** –Diethyl pyrocarbonate

**GAPDH** – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

**PFEMP1** – Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1

**mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**cDNA** – Ácido desoxirribonucleico complementar

**ECM** – Malária cerebral experimental

**PbA** – *Plasmodium berghei* ANKA

**Ext-Ts** – Extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum*

**CQ** – Cloroquina

**Ct** – Cycle treshold

**qPCR** - Reação em cadeia da polimerase quantitativa

**IFN-γ** – Interferon gamma

**TNF-α** – Fator de necrose tumoral alfa

**IL-10** – Interleucina 10

**IL-1β** – Interleucina 1 beta

**TGF-β** – Fator de transformação do crescimento beta

**NO** – oxido nítrico

**iNOS** – Óxido nítrico-sintase induzida

**ICAM-1** – Molécula de adesão intercelular-1

**VCAM-1** – Molécula de adesão celular vascular 1

**SMAC** – schizont membrane-associated cytoadherence protein

**ATPases** – adenosinatrifosfatases

**PfATP4** – *Plasmodium falciparum* ATPase 4

**ACTs** – Artemisinin-based combination therapies



**TGP** – Transaminase glutâmico pirúvica

**-/-** – Knockout

**JAK1 / JAK2** – Janus kinase 1/ Janus kinase 2

**STAT1** – Signal transducer and activator of transcription 1

## SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Gênero <i>Plasmodium</i> .....	12
1.2. Malária.....	12
1.3. Mecanismos de transmissão e ciclo evolutivo de <i>Plasmodium</i> .....	13
1.4. Invasão e mecanismos de evasão do parasito.....	14
1.5. Resposta imunológica na infecção por <i>Plasmodium</i> .....	15
1.6. Mecanismos de patogenicidade durante a malária cerebral.....	16
1.7. Tratamento da malária.....	17
1.8. Atividade antibiótica de substâncias de origem fúngica.....	18
1.9. <i>Trichoderma stromaticum</i> .....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Manutenção de cultivos de <i>Trichoderma stromaticum</i> .....	23
3.2. Obtenção do extrato de <i>Trichoderma stromaticum</i> .....	23
3.3. Cepa do parasito.....	23
3.4. Animais experimentais e aprovação pelo comitê de ética.....	23
3.5. Procedimento experimental.....	24
3.6. Avaliação do escore de morbidade.....	24
3.7. Análise de parasitemia.....	25
3.8. Eutanásia dos animais, coleta de amostras e órgãos.....	26
3.9. Determinação do hematócrito.....	26
3.10. Análise histológica.....	26
3.11. Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica.....	27
3.12. Avaliação de edema cerebral e pulmonar.....	27
3.13. Análise da deposição de hemozoína no fígado.....	27
3.14. Dosagem de TGP e lipídeos séricos.....	28
3.15. Análise da expressão de mRNA para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ , iNOS, ICAM-1 e VCAM-1 no cérebro.....	28
3.16. Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Definição da dose e tempo de tratamento.....	30
4.2. Sobrevivência, escore de morbidade e hematócrito.....	30
4.3. Análise da parasitemia.....	33
4.4. Dosagem de lipídeos séricos.....	33
4.5. Análise das alterações histológicas e da deposição de hemozoína no fígado.....	34
4.6. Análise histológica e avaliação de edema no pulmão.....	38
4.7. Análise histológica do cérebro, avaliação da integridade da barreira hematoencefálica e de edema cerebral.....	38
4.8. Análise da expressão de mRNA para IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, TGF- $\beta$ , iNOS, ICAM-1 e VCAM-1 no cérebro.....	42
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
8. ANEXOS.....	60

## RESUMO

A malária é um grave problema de saúde pública. Os medicamentos de escolha para tratar a doença são as terapias baseadas em combinações de artemisininas. Porém, uma crescente resistência à estas drogas tem sido reportada. A presente investigação teve como objetivo avaliar o papel do extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts) em camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, um conhecido modelo experimental de malária cerebral experimental. Foram monitoradas as manifestações clínicas, histológicas, imunológicas e bioquímicas características da infecção. Observou-se que o tratamento com Ext-Ts foi capaz de prevenir as alterações neurológicas associadas à malária cerebral experimental, diminuir os níveis de parasitemia e aumentar significativamente a sobrevivência de animais infectados. Além disso, foi observado que em camundongos tratados com Ext-Ts houve diminuição dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e TGP no soro, menor deposição de hemozoína no fígado, atenuação da intensidade do edema pulmonar, proteção da integridade da barreira hematoencefálica, assim como menor citoaderência e achados histopatológicos nos tecidos avaliados, quando comparado com camundongos infectados não tratados. Esta proteção foi associada com uma diminuição na expressão de IFN- $\gamma$  e ICAM-1 no cérebro dos animais tratados em relação a animais não tratados. Estes resultados sugerem que o Ext-Ts é uma potencial fonte de compostos antimaláricos e/ou imunomoduladores que poderiam melhorar o tratamento atual no contexto do aumento da resistência aos derivados da artemisinina.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium berghei* ANKA, *Trichoderma stromaticum*, extrato fúngico.

## ABSTRACT

Malaria is a severe health problem. The first-line treatment against the disease are the artemisinin-based combination therapies. However, increased resistance to these drugs has been reported. The aim of this study was to evaluate the role of crude etanolic extracts of *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts) in C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA, a well-known model of experimental cerebral malaria. Clinical, histological, immunological and biochemical features of the infection were monitored. It was found that Ext-Ts treatment was able to prevent neurological alterations associated with experimental cerebral malaria, decreased parasitemia levels and significantly improved survival of infected animals. Furthermore, it was observed that in Ext-Ts-treated mice a reduction of total serum cholesterol, triglycerides and TGP, lower hemozoin deposition into the liver, attenuation of pulmonary edema intensity, integrity of the blood-brain barrier as well as fewer cytoadherence and histopathological findings in assessed tissues in comparison with untreated infected mice. This protection was associated with decreased IFN- $\gamma$  and ICAM-1 mRNA expression in brain of treated animals compared with untreated animals. These results suggest that Ext-Ts is a potential source of antimalarial and immunomodulatory compounds that could improve the current treatment in the context of resistance to artemisinin derivatives.

**Keywords:** Malaria, *Plasmodium berghei* ANKA, *Trichoderma stromaticum*, fungal extract.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Gênero *Plasmodium*

Os membros do gênero *Plasmodium* pertencem ao filo Apicomplexa e são parasitos intracelulares de eritrócitos e hepatócitos que causam a doença conhecida como malária. Atualmente, foram descritas 5 espécies de *Plasmodium* capazes de infectar humanos causando essa doença: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, embora este último seja conhecido por parasitar apenas espécies de macacos, estudos recentes demonstraram que também pode ser transmitido de maneira zoonótica para a espécie humana (BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). As espécies causadoras de malária humana mais estudadas são *P. falciparum* e *P. vivax*. Embora *P. vivax* tenha uma distribuição mundial ampla, *P. falciparum* causa uma maior quantidade de mortes anualmente (GUERRA et al., 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Existem também espécies que parasitam roedores, tais como *P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. vinckei* e *P. berghei* (KILLICK-KENDRICK, 1978). Os modelos de malária em roedores oferecem uma oportunidade para o estudo da eficácia de medicamentos e mecanismos de resposta imune em humanos, devido à similaridade nas respostas imunes e patológicas em humanos e murinos (LAMB et al., 2006).

### 1.2. Malária

Na década de 1870, com os avanços científicos alcançados por Pasteur e Koch na área de bacteriologia, pensava-se que a malária era causada por uma bactéria. Em 1880, o cientista francês Charles Louis Alphonse Laveran, partindo do conhecimento de que o baço de pacientes portadores da doença apresentava um pigmento, começou a procurar este em amostras de sangue fresco de pessoas infectadas, observando distintos estágios do parasito nas hemácias, para logo apresentar seus achados e conclusões à Academia Francesa de Ciências Médicas. Seus resultados foram recebidos com ceticismo pela comunidade científica, pois suas observações foram consideradas desintegração das hemácias; contudo, nos anos seguintes as suas descobertas ganharam aceitação pelos mais importantes cientistas da época, sendo premiado com o Prêmio Nobel de Medicina em 1907. Ronald Ross elucidou o ciclo de transmissão completo, Marchiafava e Celli deram o nome genérico de *Plasmodium* e Romanowsky desenvolveu um método aprimorado para coloração de esfregaços facilitando o estudo da morfologia parasitária (COX, 2010; HARBACH, 2004).

A malária pode se apresentar como malária não complicada ou malária grave. Na malária não complicada o indivíduo infectado tem sintomas inespecíficos como febre, cansaço, fadiga, sudorese, dores de cabeça, dores musculares e articulares, vômitos e debilidade física. Quando não tratada ou quando o tratamento é ineficaz, há um aumento na carga parasitária sendo possível desenvolver a malária grave, na qual se observam uma ou mais das seguintes manifestações clínicas: coma (malária cerebral), anemia grave, icterícia, hipoglicemia, choque, convulsões, insuficiência renal aguda ou edema pulmonar agudo; sendo que, na maioria dos casos quando não tratada pode ser fatal (GROBUSCH; KREMSNER, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Um número estimado de 212 milhões de casos de infecção e 429 mil mortes por malária ocorreram no ano 2015 a nível mundial, sendo as regiões da África as mais afetadas. Na região das Américas 30% dos casos registrados se apresentaram na Venezuela, 24% no Brasil, 19% no Peru e 10% na Colômbia, constituindo um grave problema de saúde pública na região da Amazônia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

### **1.3. Mecanismos de transmissão e ciclo evolutivo de *Plasmodium***

A principal via de transmissão de *Plasmodium* é a vetorial, por meio da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. Porém, em raras ocasiões, o parasito pode ser transmitido por via transfusional, transplacentária, por transplante de órgãos e pelo uso compartilhado de seringas em usuários de drogas injetáveis (ALVES; LIMA; RANGEL, 1995; BARATA; ANDRIGUETTI, 1993; MEJIA et al., 2006; MUNGAI; TEGTMEIER; CHAMBERLAND, 2001).

*Plasmodium*, durante seu ciclo evolutivo, se desenvolve em formas sexuadas, no vetor invertebrado, e assexuadas, em hospedeiros vertebrados (aves, répteis e mamíferos incluindo o homem) apresentando assim uma fase pré-eritrocítica ou hepática e uma fase eritrocítica (BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2013). O ciclo inicia-se quando o inseto vetor deposita as formas de esporozoítos, contidas em suas glândulas salivares, na derme do hospedeiro vertebrado ao realizar o repasto sanguíneo. Esses esporozoítos atingem a circulação sanguínea chegando ao fígado, onde invadem a única célula alvo desse estágio: os hepatócitos. Nas infecções causadas por *P. vivax*, algumas formas parasitárias (hipnozoítos) permanecem latentes no fígado por semanas ou meses para depois retomarem a replicação (BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2013; SHANKS; WHITE, 2013; SICILIANO; ALANO, 2015). Nos hepatócitos, os parasitos se desenvolvem em merozoítos e saem dessas células através de

vesículas formadas pela membrana das células hepáticas denominadas merossomas, alcançam a corrente sanguínea, onde invadem as hemácias desenvolvendo parasitos nos estágios de anel, trofozoíto e posteriormente esquizonte (STURM et al., 2006). Sob certos estímulos, as formas parasitárias eritrocíticas podem gerar gametócitos masculinos e femininos que, quando ingeridos pelo vetor invertebrado, fundem-se e entram em divisão meiótica gerando os zigotos que vão se aderir ao intestino do vetor como oocistos. Estes, por sua vez, ao se desenvolverem geram esporozoítos móveis que migram às glândulas salivares do inseto reiniciando o ciclo (FUJIOKA; AIKAWA, 2002; KOOIJ; MATUSCHEWSKI, 2007).

#### **1.4. Invasão e mecanismos de evasão do parasito**

A patogênese da infecção é provocada pelos estágios assexuados do parasito envolvendo alterações hematológicas, junto a reações imunológicas locais e sistêmicas, acarretando em manifestações clínicas de intensidade variável (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014). Os órgãos mais comumente comprometidos durante a doença são cérebro, fígado, baço, rins, e pulmões (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

A invasão pelo parasito começa com a orientação do mesmo, assim como o acoplamento aos receptores das hemácias e envolve a exocitose de três organelas secretoras: micronemas, roptrias e grânulos densos; com a consequente liberação de moléculas dessas organelas apicais induzindo a produção de um vacúolo parasitóforo derivado da membrana celular, através do qual o parasito invade a célula hospedeira (CHITNIS, 2001; MILLER et al., 2013; WARD; MILLER; DVORAK, 1993). Após o ingresso na célula, *P. falciparum* produz proteínas de aderência que ocasionam o sequestro de hemácias infectadas ao endotélio vascular, por meio da união de receptores e moléculas de adesão do hospedeiro. Assim, o patógeno se dissemina para diferentes órgãos e consegue se multiplicar evitando a remoção das hemácias infectadas no baço (BUFFET et al., 2011).

*P. falciparum* é capaz de evadir da resposta imune do hospedeiro por meio da expressão de adesinas na membrana celular das hemácias, da variação e diversidade antigênica que permite ao parasito expressar diferentes versões do mesmo antígeno sem alterar seu genótipo, da modulação da função das células dendríticas e da saída dos parasitos do fígado através dos merossomas compostos por membranas celulares próprias do hospedeiro, assegurando assim o trânsito pela corrente sanguínea sem ativar a resposta imune (CRAIG; SCHERF, 2001; FERREIRA; ZILVERSMIT; WUNDERLICH, 2007; STURM et al., 2006; URBAN et al., 1999).

### 1.5. Resposta imunológica na infecção por *Plasmodium*

A resposta imune à infecção por *Plasmodium* é desenvolvida por mecanismos celulares e humorais. A patologia é induzida por uma resposta inflamatória elevada contra os estágios assexuados do parasito, sendo desencadeada durante período de ruptura das hemácias infectadas, com a liberação de pigmentos maláricos, detritos celulares e resíduos do metabolismo parasitário no sistema circulatório (BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2013). A proteção contra *Plasmodium* é dada principalmente por uma resposta pró-inflamatória de tipo Th1, típica em infecções por patógenos intracelulares, apresentando uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- $\gamma$ , assim como a liberação de mediadores oxidativos como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (LEVESQUE et al., 1999; TORRE et al., 2002). Durante a malária cerebral a produção excessiva de IFN- $\gamma$  induz a ativação do endotélio vascular, a migração de células T CD8<sup>+</sup> e aumento da expressão de moléculas de adesão tais como ICAM-1, VCAM-1, CD36 e P-selectina no endotélio vascular cerebral (DE SOUZA et al., 2010; FONAGER et al., 2012; HUNT et al., 2014).

Com relação à fase pré-eritrocítica da infecção por *Plasmodium*, durante a picada do inseto vetor, os esporozoítos são injetados no tecido subcutâneo e após a diminuição da sua motilidade, as células dendríticas os internalizam e apresentam seus antígenos às células T CD4<sup>+</sup>, que produzem IL-4, uma das citocinas que ativa a resposta efetora das células T CD8<sup>+</sup> anti-esporozoíto nos nódulos linfáticos cutâneos e no fígado (AMINO et al., 2006; CARVALHO et al., 2002). Nos linfonodos cutâneos os linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem antígeno parasitário apresentado por células dendríticas; esses linfócitos efetores circulam ao fígado e lá essas células reconhecem antígenos dos parasitos apresentados pelos hepatócitos (CHAKRAVARTY et al., 2007). Durante a fase eritrocítica da infecção, ocorre a ativação de células T CD4<sup>+</sup> por meio da apresentação de antígenos maláricos pelas células dendríticas. A fase eritrocítica aguda é caracterizada por uma alta produção de IFN- $\gamma$ , que estimula a eliminação dos parasitos e das hemácias infectadas pelos macrófagos (DEROOST et al., 2016; RILEY; STEWART, 2013).

Apesar de alguns indivíduos em áreas endêmicas estarem expostos aos esporozoítos em intervalos regulares e apresentarem imunidade frente à malária, ainda não estão bem elucidados os mecanismos específicos que atuam junto com a imunidade adquirida para produzir essa proteção (MARSH; KINYANJUI, 2006). Wammes e colaboradores (2013), sugeriram que a sobrevivência dos parasitos em hospedeiros assintomáticos poderia ser resultante de um aumento na expressão de receptores do tipo II de TNF (TNFR2) em células T reguladoras (Treg), assim como de uma supressão da produção de citocinas do perfil Th2.



Ainda não existem vacinas disponíveis para a malária, o RTS,S, que tem como alvo a maior proteína de superfície dos esporozoítos de *P. falciparum*, representa o candidato vacinal mais avançado em ser testado em humanos, uma vez que esse se encontra em fase III de ensaios clínicos em humanos (AGNANDJI et al., 2012; KAZMIN et al., 2017).

### **1.6. Mecanismos de patogenicidade durante a malária cerebral**

A malária cerebral é a forma mais grave da malária e consiste em encefalopatia decorrente da infecção por *P. falciparum* acompanhada de alterações neurológicas, sendo o coma a mais relevante, em indivíduos nos quais outras causas de coma podem ser excluídas (Revisado em: BERENDT; TUMER; NEWBOLD, 1994). Em um sentido mais estrito, a malária cerebral pode ser definida como um profundo nível de inconsciência (incapacidade de localizar estímulos dolorosos), após convulsões generalizadas, na presença de parasitemia por *P. falciparum*, após correção da hipoglicemia e exclusão de outras encefalopatias, em especial meningite bacteriana e encefalite viral (WHO, 1986). A malária cerebral em adultos é considerada como uma doença de múltiplos órgãos (IDRO et al., 2010), sendo acompanhada com frequência de múltiplas disfunções sistêmicas. A coexistência com anemia grave, icterícia, acidose respiratória, falha renal e edema pulmonar podem piorar o prognóstico (NEWTON; HIEN; WHITE, 2000). A infecção de camundongos da linhagem C57BL/6 com *P. berghei* ANKA reproduz a maioria das manifestações clínicas associadas à malária cerebral, produzindo a síndrome letal conhecida como malária cerebral experimental (HANUM ; HAYANO; KOJIMA, 2003).

Os mecanismos que desencadeiam a malária cerebral ainda não são totalmente compreendidos. É de particular interesse entender como o *Plasmodium*, sendo um parasito intracelular que permanece dentro da hemácia no compartimento vascular, é capaz de causar profundas alterações neurológicas até levar à morte do indivíduo. Embora existem várias teorias que tentam explicar os achados patológicos observados na malária cerebral, apenas três delas são as mais aceitas: a mecânica, a humoral e a da permeabilidade (MEDANA; TURNER, 2006; SHIKANI et al., 2012).

A hipótese mecânica é a mais aceita e propõe que proteínas parasitárias interagem com receptores e moléculas de adesão no endotélio vascular do hospedeiro mediando a citoaderência e sequestro de hemácias infectadas, que resulta na obstrução dos vasos sanguíneos e consequente necrose devido à isquemia e hipóxia dos tecidos afetados (BERENDT; TUMER; NEWBOLD, 1994; HUNT et al., 2014). A principal molécula parasitária envolvida nesta interação durante a malária por *P. falciparum* é a PfEMP1. Esta proteína é exportada para a membrana da hemácia formando protuberâncias (*knobs*) que facilitam a exposição e ligação

com moléculas do endotélio vascular (SMITH et al., 2001). Em contraste, a principal característica durante a ECM é a citoaderência de leucócitos e plaquetas ao endotélio vascular, embora tem sido demonstrada aderência de hemácias parasitadas a células endoteliais pulmonares (EL-ASSAAD et al., 2013; HEARN et al., 2000; SUN et al., 2003). Apesar de que pouco se sabe sobre as proteínas parasitárias que poderiam mediar a citoaderência em modelos murinos, proteínas como SMAC e Pb-fam têm sido correlacionadas com esta manifestação na infecção por PbA (FONAGER et al., 2012). Em ambos os modelos, ICAM-1, VCAM-1, CD36 e P-selectina são as moléculas do hospedeiro cuja alta regulação no cérebro tem sido correlacionada com citoaderência de células às células endoteliais vasculares (DE SOUZA et al., 2010; FONAGER et al., 2012).

Por outro lado, a presença de sequestro de células ao endotélio vascular nem sempre é observada em casos de malária cerebral. Portanto, embora esse mecanismo seja importante, pode não ser o único envolvido na patogênese da malária. A hipótese humoral propõe que o hospedeiro (e não o parasito) é responsável pela produção de moléculas tóxicas, enquanto que o papel do parasito é apenas induzir a liberação dessas substâncias (CLARK; ROCKETT, 1994). A inflamação vascular durante a malária cerebral é um processo multifatorial que envolve a interação de hemácias parasitadas com monócitos e células endoteliais induzindo à regulação aumentada de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , NO e IL-1 $\beta$  que levam à ativação endotelial, febre e coma (SHIKANI et al., 2012).

A barreira hematoencefálica constitui uma interface chave entre o sangue e o sistema nervoso central, restringindo o fluxo de moléculas entre a corrente sanguínea e o parênquima cerebral. A hipótese da permeabilidade está baseada no comprometimento da barreira hematoencefálica com passagem de moléculas tóxicas (produtos parasitários, ácido láctico) para o tecido cerebral, hemorragia e produção de edema (PENET et al., 2005; SHIKANI et al., 2012). Neste sentido, estudos sugerem que durante a infecção por *Plasmodium*, o parasito é capaz de produzir mudanças na microvasculatura cerebral, tais como alterações na ultraestrutura e redistribuição de proteínas das junções intercelulares nas células endoteliais assim como pequena, mas perceptível, entrada de proteínas plasmáticas para o parênquima cerebral (BROWN et al., 1999, 2001).

Essas teorias de patogenicidade não são mutuamente exclusivas. Parece ser mais provável que combinações dos eventos que as constituem, sejam capazes de desencadear a síndrome neurológica durante a malária cerebral (COMBES et al., 2006).

### 1.7. Tratamento da malária

O tratamento contra a malária não complicada em crianças e adultos, exceto mulheres no primeiro trimestre de gestação, baseia-se em terapias com combinações de artemisinina (ACTs) e possui uma duração de três dias. As ACTs são combinações de doses fixas de um derivado de artemisinina de ação rápida, tais como artesunato, artemeter, e dihidroartemisinina, que agem em associação com outra droga de ação mais prolongada, como lumefantrina, amodiaquina, mefloquina, piperquina ou sulfadoxina-pirimetamina. O objetivo do tratamento é eliminar a infecção o mais rápido possível e prevenir o avanço da doença para o estágio de malária grave, no qual o tratamento é baseado na administração intravenosa e intramuscular de artesunato por ao menos 24 horas, até que o paciente possa tolerar tratamento oral, completando o mesmo após três dias com as ACTs. O objetivo deste tratamento é evitar a morte do indivíduo, pois a malária grave, em especial a cerebral, tem uma taxa de mortalidade de aproximadamente 100% quando não tratada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). A primaquina constitui o tratamento de escolha em infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, uma vez que essa droga consegue eliminar os hipnozoítos do fígado, contudo este medicamento é de curso prolongado e pode causar hemólise em indivíduos com deficiência de glucose-6-fosfato-desidrogenase, uma característica muito comum nas áreas endêmicas (BEULER, 1959; FLANNERY; CHATTERJEE; WINZELER, 2014). A tafenoquina é um derivado sintético da primaquina que também apresenta atividade anti-hipnozoíto, porém ainda se encontra em fase III de ensaios clínicos em humanos (JEAN et al., 2016).

Uma das principais preocupações em relação ao tratamento com derivados de artemisinina é o aparecimento de cepas resistentes a essas drogas. Neste sentido, a malária se tornou um grave problema de saúde pública devido à rápida propagação de cepas de *P. falciparum* resistentes aos medicamentos no Sul da Ásia (DONDORP et al., 2009; KYAW et al., 2013). Estudos anteriores demonstraram que mutações na Pfk13 (*Plasmodium falciparum* kelch superfamily protein-13) são responsáveis pela resistência a derivados de artemisinina em cepas de *P. falciparum* (STRAIMER et al., 2015). Outro aspecto importante é que os derivados de artemisinina têm origem vegetal e, conseqüentemente, precisam de um tempo estimado de 18 meses até a produção do medicamento, apesar de que as técnicas de cultivo têm sido melhoradas (WELLS; VAN HUIJSDUIJNEN; VAN VOORHIS, 2015). Devido a estas razões, é necessário encontrar ou desenvolver novas terapias que possam complementar ou substituir as atuais. Neste sentido, a espiroindolona KAE609 (Cipargamin ou NIT609) (ROTTMANN et al., 2010), uma potente droga antimalárica que atua inibindo ATPases de tipo P, tem sido utilizada em fase II de ensaios clínicos para tratar malária não complicada por *P. vivax* e *P.*

*falciparum* (GOLDGOF et al., 2016). Porém, em isolados provenientes do Camboja (Sul da Ásia) tem apresentado evidências de mutações leves nas ATPases de tipo P (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-ATPase, PfATP4), o qual poderia resultar em aparecimento de resistência contra essa droga (LEE; FIDOCK, 2016).

### 1.8. Atividade antibiótica de substâncias de origem fúngica

Em 1929, Alexander Fleming descobriu uma poderosa substância, após a contaminação acidental de culturas de *Staphylococcus aureus* com o fungo *Penicillium notatum*. Esta substância se denominou como penicilina e foi o primeiro antibiótico de amplo espectro a ser comercializado (FLEMING, 1941). Desde esses tempos, têm sido descobertos milhares de metabólitos secundários provenientes de fungos, com capacidade de inibir o crescimento de bactérias, parasitos, células tumorais e inclusive outros fungos. Atualmente, além da penicilina, compostos fúngicos de baixo peso molecular tais como cefalosporinas, ciclosporinas, ergotrate, ácido micofenólico, compactinas, gliotoxinas e estatinas têm tido usos diversos na prática clínica (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; KÜCK; BLOEMENDAL; TEICHERT, 2014).

Os peptaibióticos ou *peptaibols* são definidos como peptídeos lineares de origem fúngica, constituídos por 5-20 resíduos de aminoácidos e caracterizados pela presença de aminoácidos não proteinogênicos assim como uma alta proporção de ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Aib) que permite a formação de estruturas helicoidais estáveis que conferem resistência contra a degradação destas moléculas por enzimas hidrolítica. Esses peptídeos têm uma produção não-ribossomal uma vez que são sintetizados por enzimas *peptaibol* sintetase. Tem sido demonstrado que essas substâncias exercem atividade antibiótica devido à sua capacidade de formar canais iônicos dependentes de voltagem nas membranas, inibição do crescimento e produção de morte celular (DEGENKOLB et al., 2006, 2012; DRUZHININA; SEIDL-SEIBOTH, 2011). Os peptídeos antibióticos deste tipo são metabólitos secundários produzidos por espécies de fungos filamentosos presentes em solos, ambientes aquáticos, matéria em decomposição, plantas patogênicas, dentre outros ambientes (DRUZHININA; SEIDL-SEIBOTH, 2011; KRAUSE; KIRSCHBAUM; BRÜCKNER, 2006)

### 1.9. *Trichoderma stromaticum*

O gênero *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) é um amplo grupo de fungos saprofíticos comumente isolados de solo e madeira. Muitos fungos são antagonizados e inclusive degradados totalmente pela ação de enzimas produzidas por espécies de *Trichoderma*

(BROTMAN; KAPUGANTI; VITERBO, 2010). Desta maneira, os fungos do gênero *Trichoderma* são potentes micoparasitos nos quais têm sido caracterizados compostos voláteis e não voláteis com capacidade antimicrobiana (DEGENKOLB; BERG; GAMS, 2003; DEGENKOLB et al., 2006).

Sendo da divisão Ascomycota, *Trichoderma stromaticum* representa o anamorfo, ou forma assexual, do telemorfo, ou forma sexual, de *Hypocrea stromaticum*. *T. stromaticum* é um fungo filamentoso que possui conidióforos com fiáides agrupadas em ramos laterais curtos, conídios glabros, oblongos e elipsoidais, e abundantes clamidósporos. A temperatura ótima para seu desenvolvimento é 25 °C, na qual expressa em meio Ágar Batata Dextrosa, colônias radiadas, densas, geralmente de cor branca, com conídios brancos que com o tempo podem variar entre os tons de amarelo, verde ou verde amarelado (SAMUELS et al., 2000).

*T. stromaticum* foi descrito antigamente na literatura como *Trichoderma viride* e *Trichoderma polysporum*. Contudo, dados moleculares demonstraram que *T. stromaticum* representa uma espécie a parte, mais relacionada filogeneticamente às espécies *T. harzianum* e *T. virens* (SAMUELS et al., 2000). *T. stromaticum* tornou-se importante logo que Bastos (1996) isolara este fungo de vassouras-de-bruxa em cacauzeiros no Nordeste do Brasil. Estudos posteriores demonstraram que o fungo *T. stromaticum* tem efeito benéfico inibindo o desenvolvimento de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosus*, um fungo patogênico ao cacau (SAMUELS et al., 2000; SANOGO et al., 2002). A utilização de Tricovab, um produto comercial baseado na produção de *T. stromaticum* em grande escala, tem tido uma rápida aceitação entre os agricultores de cacau, sendo não patogênico para humanos, animais ou plantas (POMELLA; SOUZA; NIELLA, 2007).

Atualmente, as atividades biológicas relacionadas a novas drogas antimaláricas estão associados ao bloqueio da transmissão e a eliminação das formas inativas do parasito no fígado. Com a rápida disseminação de cepas resistentes aos medicamentos de escolha se faz necessário ter em vista novas drogas que possam complementar ou substituir as atuais (NOEDL; WONGSRICHANALAI; WERNSDORFER, 2003). Os fungos endófitos são abundantes na natureza e produzem uma grande quantidade de metabólitos secundários com poder bioativo comprovado contra os parasitos da malária. Durante a incessante pesquisa na busca de novos agentes antimaláricos, têm sido testados vários extratos de fungos como uma potencial fonte de metabólitos de origem natural, sendo que *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazei* e diversos fungos endófitos tem exibido atividade antimalárica (HIGGINBOTHAM et al., 2013; OLUBA et al., 2012; VAL et al., 2015). No caso de *T. stromaticum*, alguns peptaibióticos tem sido identificados dentre seus metabólitos secundários (DEGENKOLB et al., 2006), embora os

efeitos antimaláricos de moléculas derivadas desse fungo ainda não tinham sido testados. Além disso, o tratamento intranasal com esporos de *T. stromaticum* foi capaz de diminuir os níveis de produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 por células do baço estimuladas com Concanavalina A in vitro, provenientes de camundongos BALB/c (ALVES-FILHO et al., 2011).

A presente investigação teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com o extrato etanólico bruto de *T. stromaticum* de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa *P. berghei* ANKA e verificar os parâmetros clínicos, histológicos, imunológicos e bioquímicos influenciados por esse tratamento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Determinar o efeito do extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* na infecção experimental de camundongos C57BL/6 com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Manter cultivos axênicos de *T. stromaticum* e produção do extrato etanólico bruto de *T. stromaticum*.
- Definir o efeito do extrato bruto de *T. stromaticum* na parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa ANKA de *P. berghei*.
- Avaliar o escore de morbidade em animais tratados com o extrato bruto de *T. stromaticum* e infectados com *P. berghei*.
- Estudar alterações histológicas no fígado, cérebro e pulmões de camundongos infectados e tratados em relação a camundongos controles infectados e não tratados com extrato de *T. stromaticum*.
- Avaliar a expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 e TGF- $\beta$ , da Sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) e das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 em camundongos infectados e tratados em relação a camundongos controles infectados e não tratados com o extrato bruto de *T. stromaticum*

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Manutenção de cultivos de *Trichoderma stromaticum***

O isolado do fungo *T. stromaticum* ALF 64, usado na preparação do Tricovab® (Cepec-Ceplac, Centro de Pesquisas do Cacau - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) foi gentilmente cedido pela Dr<sup>a</sup>. Jane Lima dos Santos (Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus- BA). O fungo *T. stromaticum* foi cultivados em placas de Petri com meio de cultura Agar batata dextrose durante 7 a 15 dias ou até a observação da produção de conídias (esporulação), em uma temperatura de 25°C, ao abrigo de luz. Em seguida, o fungo foi repicado para outra placa para dar continuidade ao cultivo ou para ser coletado para preparar o extrato (SANOGO et al., 2002).

#### **3.2. Obtenção do extrato de *Trichoderma stromaticum***

A superfície micelial das placas de Petri contendo o fungo foram lavadas com etanol 95%. A solução etanólica coletada foi homogeneizada em agitador por 24 horas e em seguida centrifugada a 2,200 ×g por 20 minutos a 25 °C (FUKUZAWA et al., 2008). Essa solução etanólica foi submetida a secagem ao vácuo, o extrato obtido foi pesado, filtrado e ressuspendido em PBS. Esse extrato etanólico bruto de *T. stromaticum* (Ext-Ts) foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

#### **3.3. Cepa do parasito**

A cepa ANKA de *P. berghei* expressando GFP foi usada para infectar os animais neste estudo. A cepa foi mantida em nitrogênio líquido e descongelada para realizar duas passagens por via intraperitoneal em camundongos C57BL/6. Após a segunda passagem, sangue com predomínio de hemácias parasitadas em estágio de anel foi coletado da cauda do camundongo infectado. Essas hemácias foram utilizadas para infectar os animais dos grupos de estudo.

#### **3.4. Animais experimentais e aprovação pelo comité de ética**

Camundongos C57BL/6 machos com idade entre 8-12 semanas, foram utilizados como modelo experimental na presente investigação. Esses foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia em condições livres de patógenos específicos em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada.



O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia sob o número de protocolo 095/15 e os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas Institucionais de Ética em Experimentação com animais.

### 3.5. Procedimento experimental

Na presente investigação foram estabelecidos 4 grupos experimentais:

- Ext-Ts, grupo teste constituído por animais infectados e tratados com o extrato.
- PBS, grupo controle negativo, no qual os animais foram infectados, mas não tratados.
- CQ, grupo controle positivo, no qual camundongos foram infectados e tratados com cloroquina como droga de referência.
- NI, grupo controle saudável, constituído por camundongos não infectados e não tratados.

Os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal (i.p) com  $5 \times 10^4$  hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA. A primeira dose do tratamento foi administrada no dia zero, quatro horas após a infecção (BERO et al., 2013). Inicialmente foram testadas doses diferentes do Ext-Ts em animais infectados. Os camundongos foram tratados com Ext-Ts nas seguintes concentrações: 50mg/kg/dia durante 10 dias, 100 mg/kg/dia durante 10 dias, 100 mg/kg/dia durante 18 dias ou 200 mg/kg/dia durante 10 dias; enquanto que os camundongos tratados com cloroquina foram tratados com 10mg/kg/dia durante 18 dias (AWAAD et al., 2014). O controle negativo recebeu 200µl de PBS diariamente. Todos os tratamentos foram administrados intraperitonealmente durante 10 ou 18 dias ou até a morte do animal antes deste tempo. A sobrevivência e variação do peso dos animais foi acompanhada diariamente.

### 3.6. Avaliação do escore de morbidade

A morbidade dos animais durante o período de teste com diferentes concentrações de Ext-Ts foi avaliada a cada dois dias segundo escore de Bartley et al. (2006). Após ser estabelecida a concentração adequada a morbidade dos animais foi avaliada, quanto ao desenvolvimento de malária cerebral a partir do 4º dia de infecção usando o escore *Rapid Murine Coma and Behavior Scale* (RMCBS). O escore RMCBS é uma escala quantitativa que permite acompanhar os sinais clínicos específicos da malária cerebral avaliando 10 parâmetros: andar, equilíbrio, desempenho motor, posição corporal, força dos membros, escape ao toque, reflexos auditivos, reflexos digitais, agressividade e higiene. Cada parâmetro é pontuado desde 0 até 2, sendo que esses valores representam mínima e máxima função, respectivamente. A pontuação de cada item é somada sendo o escore máximo total de 20 (CARROLL et al., 2010). Assim,

quanto menor é o valor do score RMCBS, mais graves são as alterações neurológicas específicas da malária cerebral no animal. Para o acompanhamento do escore RMCBS, cada animal foi colocado sobre a tampa da gaiola invertida durante o tempo necessário para avaliar todos os parâmetros.

**Tabela 1.** Parâmetros avaliados no escore RMCBS.

Parâmetro	Score	Descrição
Andar	(0-2)	Sem movimento (0), atáxico (1), movimentação normal (2)
Equilíbrio	(0-2)	Sem extensão corporal (0), extensão das patas frontais na parede (1), corpo inteiro levantado (2)
Desempenho motor	(0-2)	Nenhum (0), 2-3 cantos explorados em 90 segundos (1), exploração dos 4 cantos em 15 segundos (2)
Posição corporal	(0-2)	De lado (0), curvado (1), extensão completa (2)
Força dos membros	(0-2)	Hipotônico, sem agarre (0); débil agarre, apenas das patas frontais (1); forte agarre (2)
Escape ao toque	(0-2)	Nenhum (0), unilateral (1), bilateral e instantâneo em 3 tentativas (2)
Reflexos auditivos	(0-2)	Nenhum (0), unilateral (1), bilateral e instantâneo em 3 tentativas (2)
Reflexos digitais	(0-2)	Nenhum (0), unilateral (1), bilateral e instantâneo em 3 tentativas (2)
Agressividade	(0-2)	Nenhuma (0), tentativa de mordida durante o corte da cauda (1), tentativa de mordida antes do corte da cauda (2)
Higiene	(0-2)	Despenteadado, com faixas de pelo fora de lugar (0), empoeirado/arrepiado (1), normal/ limpo e com brilho (2)

### 3.7. Análise de parasitemia

A parasitemia dos animais experimentais foi determinada por meio de citometria de fluxo. As amostras foram coletadas diariamente a partir do quarto dia até o décimo dia de infecção. Após isso, foram coletadas a cada dois dias. A coleta foi executada colocando uma gota de sangue da cauda do camundongo em 500µl de PBS, seguida de centrifugação a 0,9×g durante 5 minutos. Posteriormente, o pellet de células foi ressuspensionado em 500µl de formaldeído 4%/0.0075% de glutaraldeído em PBS e armazenado a 4°C até o processamento em citômetro FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Foi estabelecida uma janela (*gate*) para separação das hemácias das demais células segundo tamanho e a granulosidade, e a partir dessa janela (*gate*) as hemácias infectadas foram separadas das não infectadas segundo a fluorescência das mesmas, uma vez que durante este estudo utilizou-se uma cepa do parasito que expressa GFP. Foram avaliados um total de 30000 eventos para que

posteriormente fossem analisados no software FlowJo V10. Além disso, foram feitos e avaliados esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido (Instant Prov- NewProv) como controle qualitativo.

### **3.8. Eutanásia dos animais, coleta de amostras e órgãos**

A eutanásia dos animais foi realizada no sétimo dia de infecção, sendo que os animais foram previamente anestesiados com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil)/Xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) intraperitonealmente. O sangue dos animais foi coletado através do plexo retro-orbital, após a retração do coágulo as amostras foram centrifugadas a  $1,000 \times g$  durante 10 minutos e o soro foi coletado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Após a coleta do sangue os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos (fígado, cérebro e pulmão) foram coletados e fixados em formol tamponado a 10%. Os órgãos foram incluídos em parafina e cortes histológicos de  $4\mu\text{m}$  foram realizados. Fragmentos de cérebro foram também coletados e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA.

### **3.9. Determinação do hematócrito**

O hematócrito foi avaliado mediante a coleta de sangue em capilares heparinizados, os quais foram centrifugados durante 10 minutos numa centrífuga para microhematócrito (SISLAB- Tecnologia Laboratorial Ltda- Brasil). Após a centrifugação, os valores foram obtidos por comparação com uma escala padrão para microhematócrito e os resultados expressos em porcentagens.

### **3.10. Análise histológica**

Para observação de alterações histológicas nos órgãos dos animais infectados, os cortes histológicos foram desparafinados em xilol durante 45 minutos, re-hidratados em alcoóis de concentrações decrescentes (100, 90, 80 e 70%) durante um minuto cada. Após lavagens em água corrente durante 10 minutos e água destilada durante 5 minutos, as lâminas contendo os cortes foram imersas em Hematoxilina de Harris por um minuto. Em seguida, foram realizadas lavagens em água corrente e água destilada, sendo logo após imersas em Eosina por 40 segundos e lavadas em água corrente rapidamente. Para montagem das lâminas, estas foram desidratadas em alcoóis de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), durante um minuto cada e depois mergulhadas em xilol por 30 minutos. As lâminas foram montadas usando lamínula e Goma de Damar. As análises foram feitas em dois cortes histológicos por animal, com objetivo de 40X de aumento, em ensaio duplo cego usando lâminas de cortes histológicos

de animais não infectados como controle negativo. As imagens foram capturadas usando um microscópio de luz Leica DM500 conectado a uma câmera digital Leica ICC50.

### **3.11. Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica**

A integridade da barreira hematoencefálica foi avaliada por meio da injeção do corante Azul de Evans. Camundongos não infectados (NI), infectados e tratados (Ext-Ts) ou infectados não tratados (PBS) receberam 200 µl de uma solução de Azul de Evans 2% em PBS. Após duas horas de circulação do corante, os animais foram anestesiados como foi descrito anteriormente e perfundidos através do coração com solução salina 0,9%. Em seguida, o cérebro foi coletado, pesado e homogeneizado em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% (600 µl)/acetona (1400 µl) *overnight* em tubos fechados para extrair o corante. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 1,800 ×g durante 15 minutos e a absorbância foi mensurada a 620 nm em uma leitora de placas Versa Max Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (MANAENKO et al., 2011; SILVA et al., 2010). A concentração do corante foi estimada a partir de uma curva padrão e os resultados foram expressos em µg de Azul de Evans/g de tecido.

### **3.12. Avaliação de edema cerebral e pulmonar**

O conteúdo de água no pulmão e cérebro foi estimado e considerado como uma medida da presença de edema cerebral e pulmonar. Para tal fim, no sétimo dia de infecção, camundongos não infectados (NI), infectados e tratados (Ext-Ts) ou infectados não tratados (PBS) foram profundamente anestesiados e posteriormente exanguinados, em seguida, o cérebro e os pulmões foram coletados, o excesso de sangue removido e os órgãos colocados em frascos de vidro previamente pesados. Imediatamente determinou-se o peso úmido de cada órgão em uma balança analítica e os frascos contendo os órgãos foram incubados em uma estufa a 80°C *overnight*. Transcorrido esse tempo os frascos foram pesados novamente para obter o peso seco dos órgãos. Então, a porcentagem do conteúdo de água foi calculado usando a seguinte fórmula: % conteúdo de água = [(peso úmido – peso seco) / peso úmido] × 100 (DAVIS et al., 2004; HAJ-YASEIN et al., 2011).

### **3.13. Análise da deposição de hemozoína no fígado**

Lâminas de cortes histológicos de fígado foram usadas para a análise quantitativa do acúmulo de hemozoína no tecido hepático. As imagens foram capturadas usando objetiva de 20X em um microscópio Nikon Eclipse Ti-5. Fotomicrografias de 10 campos microscópicos de cada corte histológico foram capturadas usando filtro de polarização para detectar a

depolarização causada pela hemozoína. Para cada imagem capturada com filtro de polarização, foi obtida uma imagem de microscopia de luz convencional para detecção de birrefringência causada por impurezas que poderiam se encontrar na lâmina e que poderiam agir como falsos positivos. Usando o software ImageJ versão 1.50i cada imagem foi convertida numa imagem de 8 bit em escala de cinzas, e o *threshold* foi configurado de tal maneira que os pixels ocupados pela área da hemozoína na imagem fossem corados de vermelho. Essas áreas foram mensuradas e expressas como a porcentagem da área total (número total de pixels) (FRITA et al., 2012).

### **3.14. Dosagem de TGP e lipídeos séricos**

As concentrações de TGP, colesterol total, HDL e triglicerídeos no soro dos animais em estudo foram mensuradas usando kits comerciais seguindo as instruções do fabricante para cada parâmetro (Labtest Diagnóstica S.A. - Belo Horizonte, MG). Os níveis séricos de LDL e VLDL foram obtidos utilizando a equação de Friedewald:  $LDL = \text{Colesterol total} - HDL - \text{Triglicerídeos}/5$ ; sendo que:  $\text{Triglicerídeos}/5 = VLDL$  (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

### **3.15. Análise da expressão de mRNA para IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, TGF- $\beta$ , iNOS, ICAM-1 e VCAM-1 no cérebro**

A extração de RNA foi realizada utilizando amostras congeladas de cérebro. Estas amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido para depois ser homogeneizadas em 1000  $\mu$ l de Trizol e incubadas 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 300  $\mu$ l de clorofórmio e as amostras foram agitadas durante 15 segundos, incubadas durante 3 minutos e centrifugadas a 12,000  $\times$ g por 15 minutos a 4 °C. Após isso, a fase aquosa (superior) foi transferida para um tubo novo, no qual 500  $\mu$ l de isopropanol foram adicionados. Esta mistura foi incubada durante 10 minutos para depois ser centrifugada a 12,000  $\times$ g por 10 minutos a 4 °C. Seguidamente, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 1000  $\mu$ l de etanol 75% diluído em água Mili-Q. Após agitação manual por 10 segundos as amostras foram centrifugadas 10,000  $\times$ g por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o pellet de RNA foi ressuspensionado em 60  $\mu$ l de água DPEC. A concentração de RNA foi determinada mensurando a absorbância a 260 nm em um espectrofotômetro GeneQuant (GE, USA). As amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen – USA) e transcritas em cDNA, utilizando 1 $\mu$ g de RNA e transcriptase reversa (SuperScript™ II) para a síntese da cadeia de cDNA. Todas as amostras foram submetidas a reações para detecção de mRNA para GAPDH, o qual foi utilizado como controle positivo da amplificação. A reação de PCR quantitativa

(qPCR) foi realizada na máquina de PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) usando o corante fluorescente SYBR *green* (Invitrogen – USA) seguindo as instruções do fabricante. Os *primers* foram desenhados usando o software Prime Express e as sequências são descritas na tabela 2:

**Tabela 2.** Sequências de *primers* usados para a amplificação dos genes por qPCR.

Gene	Sequências
ICAM-1	FW TCGTGATGGCAGCCTCTTATG RW TTTTATGGCCTCCTCCTGAGC
VCAM-1	FW GTTTGCAGTCTCTCAAGCTTTT RW CCGATTTGAGCAATCGTTT
iNOS	FW CGAAACGCTTCACTTCCAA RW TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
IFN- $\gamma$	FW GGCTGTTTCTGGCTGTTACTGC RW CATCCTTTTGCCAGTTCCTCC
TNF	FW CCACCACGCTCTTCTGTCTACTG RW GATCTGAGTGTGAGGGTCTGGG
IL-10	FW TTTAAGGGTACTTGGGTTGCC RW CGCATCCTGAGGGTCTTCA
TGF- $\beta$	FW GCTGAACCAAGGAGACGGAAT RW GCTGATCCCGTTGATTTC
GAPDH	FW GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG RW CAGTGTAGCCCAAGATGCCC

FW: forward; RV: reverse

Os dados da expressão gênica foram analisados em relação ao gene GAPDH usando o método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

### 3.16. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). O método Kaplan-Meier foi usado para comparar as taxas de sobrevivência dos animais experimentais e a curva de sobrevivência foi comparada usando o Teste Qui quadrado ( $\chi^2$ ) e long-rank teste. Diferenças entre grupos foram analisadas usando teste One-way e Two-way ANOVA para dados paramétricos ou Kruskal-Wallis pra dados não paramétricos, com pós-teste de comparação múltipla Bonferroni ou Dunn, respectivamente. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Definição da dose e tempo de tratamento

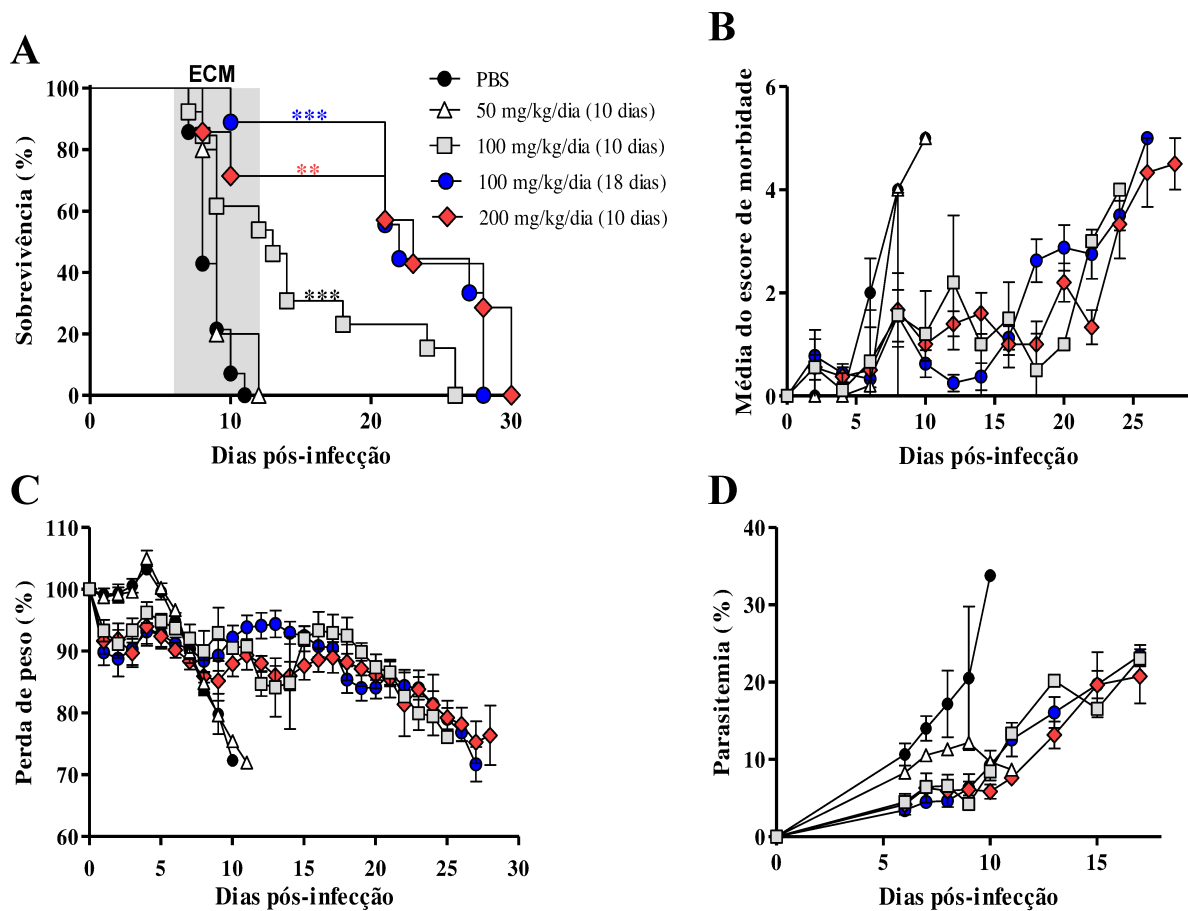
Com a finalidade de avaliar o papel do tratamento com Ext-Ts em um modelo de malária experimental, camundongos C57BL/6 foram infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com diferentes concentrações de Ext-Ts durante diferentes períodos de tempo. Neste sentido, o tratamento com 50 mg/kg/dia não conferiu proteção frente à infecção sendo que 100% dos camundongos submetidos a esse tratamento morreram simultaneamente que o controle negativo (PBS). Contrariamente, os tratamentos com 100 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia foram eficazes em aumentar a sobrevivência, diminuir a morbidade e os níveis de parasitemia de maneira significativa nos animais experimentais quando comparados com os animais do grupo controle não tratado, em especial quando tratados com 100 mg/kg/dia durante 18 dias e 200 mg/kg/dia durante 10 dias. Estes dois regimes de tratamento apresentaram efeitos semelhantes em relação à sobrevivência, perda de peso, morbidade e parasitemia dos animais (Fig. 1, Anexo 1). Porém, decidiu-se realizar os demais experimentos utilizando 100 mg/kg/dia de Ext-Ts por 18 dias, uma vez que esse tratamento exibiu melhores resultados quanto à sobrevivência. Esse regime de tratamento com 100 mg/kg/dia de Ext-Ts por 18 dias foi testado em animais não infectados, os quais não apresentaram alterações ressaltantes em quando a mortalidade, morbidade, variação do peso, hemoglobina, níveis de TGP e lipídeos, quando comparados com animais não infectados (NI) (dados não mostrados).

### 4.2. Sobrevivência, escore de morbidade e hematócrito

Verificou-se que os animais da linhagem C57BL/6 foram altamente susceptíveis à infecção, sendo que todos os animais não tratados morreram no máximo 10 dias após a infecção. Os animais tratados com 100 mg/kg de Ext-Ts foram significativamente mais resistentes à infecção quando comparados com os animais não tratados, enquanto que os animais tratados com CQ foram resultaram curados sendo que não desenvolveram a doença (Fig. 2A).

Em relação ao acompanhamento dos sinais clínicos da malária cerebral por meio do escore RMCBS, os primeiros parâmetros alterados em todos os animais infectados com PbA foram o equilíbrio e o desempenho motor. Os camundongos infectados não tratados desenvolveram ataxia e paralisia progressiva, perda da força dos membros e dos reflexos auditivos derivando na morte dos animais entre 7 e 9 dias após a infecção atingindo valores médios de 3 pontos no escore RMCBS (Fig. 2B). Em contraste, nesse período de tempo, os animais infectados tratados com Ext-Ts exibiram significativamente maiores valores no escore

RMCBS em comparação com animais não tratados ( $p<0.0001$ ). Nos animais tratados com CQ apenas o equilíbrio e o desempenho motor foram alterados, sendo que esse grupo conseguiu manter um alto escore RMBCS durante o tempo de observação, refletindo a quase ausência de sintomas específicos de ECM. Após 10 dias de infecção os camundongos tratados com Ext-Ts conseguiram manter um score estável durante 5 dias, com apenas alteração do equilíbrio, desempenho motor e posição corporal (Fig. 2B).



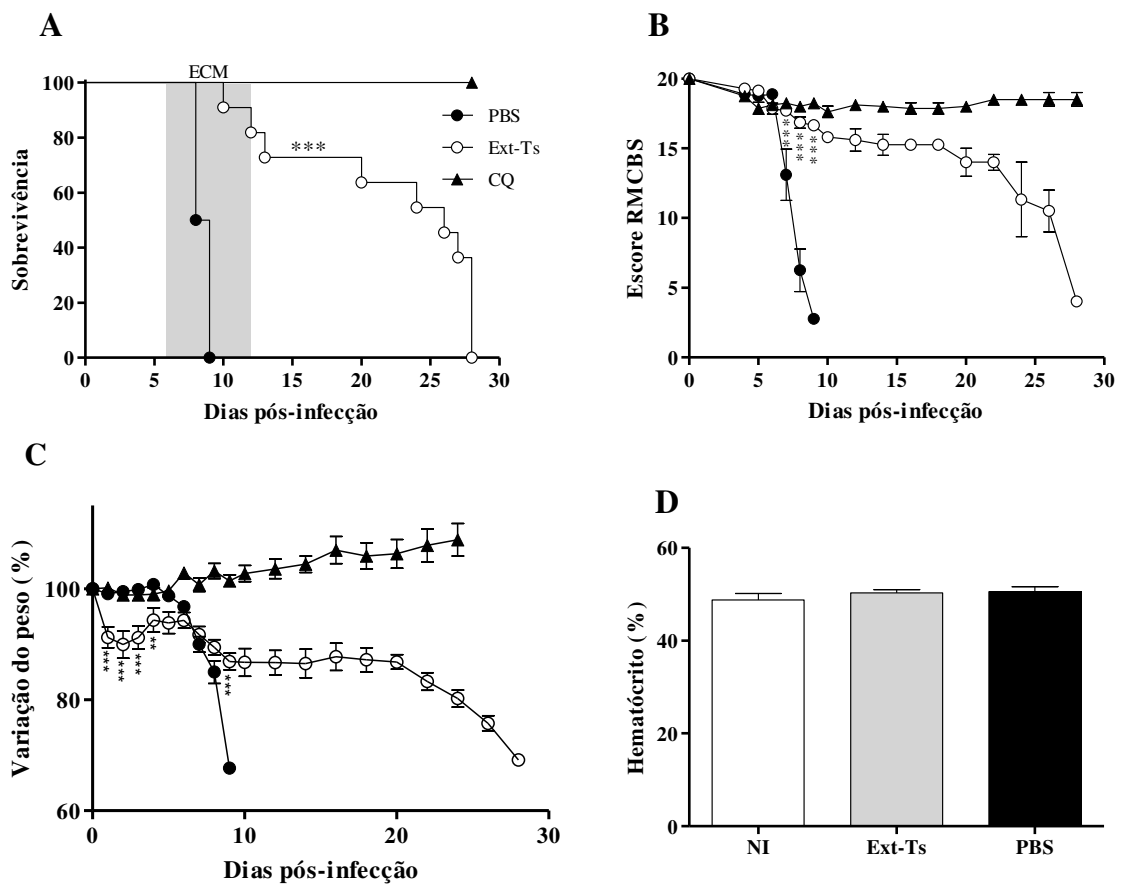
**Figura 1. Sobrevivência, morbidade, variação do peso e parasitemia de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e tratados ou não com diferentes concentrações de extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts).** Camundongos C57BL/6 inoculados com  $5 \times 10^4$  hemácias infectadas com PbA, foram tratados com 50mg/kg/dia durante 10 dias ( $n=5$ ), 100 mg/kg/dia durante 10 dias ( $n=13$ ), 100 mg/kg/dia durante 18 dias ( $n=9$ ) e 200 mg/kg/dia durante 10 dias ( $n=7$ ), quatro horas após a infecção e diariamente durante os períodos de tempo mencionados. O grupo controle negativo foi tratado com veículo (PBS,  $n=12$ ). A: Sobrevivência, a área cinza ressalta o período em que aparecem os sinais neurológicos, ocasionados pela malária cerebral experimental (ECM) e, portanto, a morte dos camundongos; B: Escore de morbidade; C: Perda de peso; D: Parasitemia. Dados são apresentados como média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média. A sobrevivência foi analisada usando o teste Qui quadrado; escore de morbidade, variação do peso e parasitemia foram analisados usando Two-way ANOVA, seguidos do pós-teste de Bonferroni (ANEXO 1). Asteriscos apontam os períodos de tempo nos quais existiram diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o grupo PBS. \*\* $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ .

Os camundongos infectados e tratados com Ext-Ts apresentaram perdas de peso significativas durante os primeiros 4 dias de infecção e tratamento quando comparados com o



grupo infectado não tratado ( $p<0,01$ ) (Fig 1C, 2C). Porém, após 9 dias de infecção os animais não tratados mostraram maior perda de peso em comparação aos animais tratados com Ext-Ts ( $p<0,001$ ). Esses últimos foram capazes de manter um peso constante por mais 10 dias, apresentando, em seguida, uma considerável redução de peso. Por outro lado, os animais tratados com CQ mantiveram o peso estável durante o tempo de observação (Fig. 2C).

O hematócrito foi mensurado em animais não infectados, infectados não tratados, e infectados tratados com Ext-Ts. Porém, não foram encontradas diferenças significativas no hematócrito desses grupos no sétimo dia de infecção e tratamento (Fig. 2D).



**Figura 2.** Sobrevivência, morbidade, variação do peso e hematócrito de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e tratados ou não com 100 mg/kg/dia de extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts). Camundongos C57BL/6 foram tratados com 100 mg/kg/dia de Ext-Ts ( $n=10$ ) ou 10 mg/kg/dia de cloroquina (CQ,  $n=8$ ) quatro horas após a inoculação dos animais com  $5 \times 10^4$  hemácias infectadas com PbA e diariamente durante 18 dias. O grupo controle negativo foi tratado com veículo (PBS,  $n=12$ ). A: Sobrevivência, a área cinza ressalta o período em que aparecem os sinais neurológicos, ocasionados pela malária cerebral experimental (ECM) e, portanto, a morte dos camundongos; B: Escore RMCBS; C: Variação do peso; D: Hematócrito no sétimo dia após a infecção. Dados são apresentados como média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. A sobrevivência foi analisada usando o teste Qui quadrado; escore RMCBS e variação do peso usando Two-way ANOVA e o hematócrito usando One-way ANOVA, seguidos do pós-teste de Bonferroni. Asteriscos apontam os períodos de tempo nos quais existiram diferenças estatísticas entre os grupos PBS e Ext-Ts. \*\* $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ .

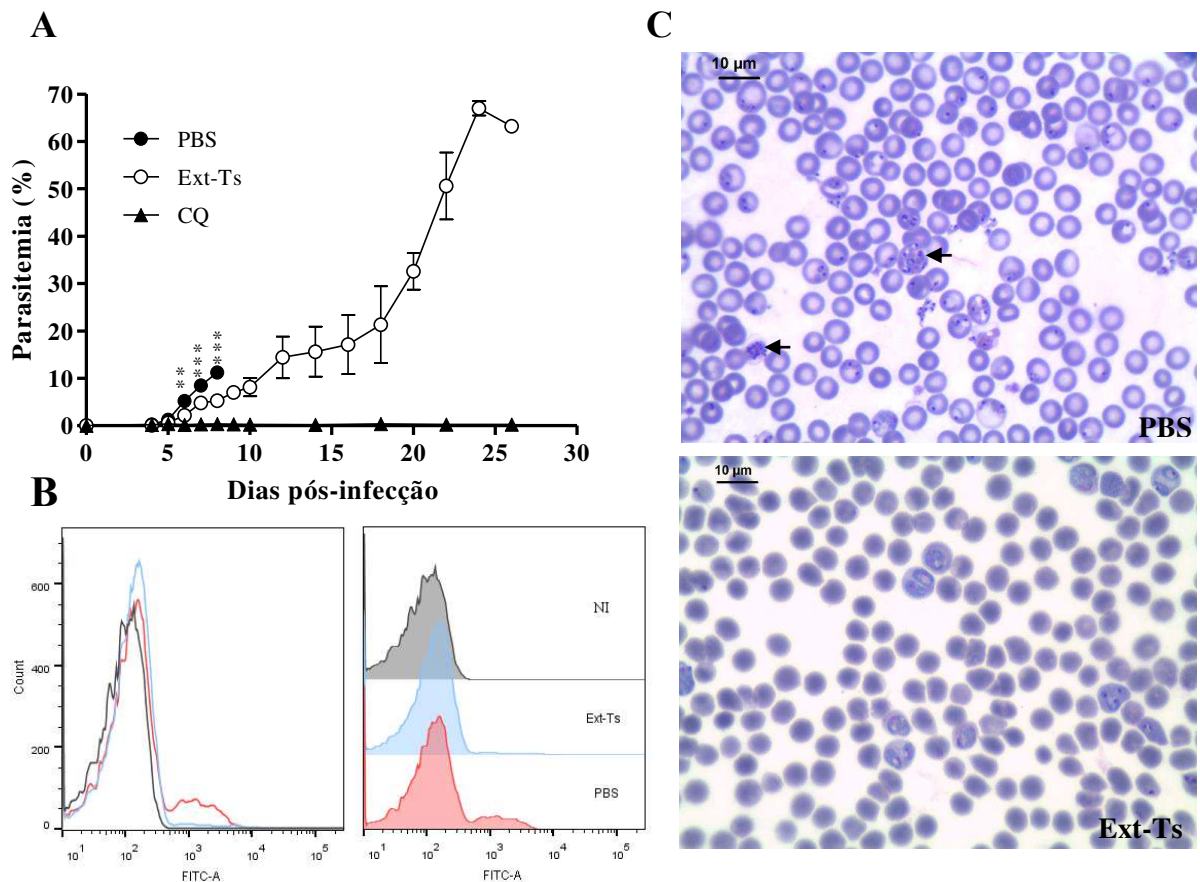
### 4.3. Análise da parasitemia

Tendo como objetivo avaliar os níveis de parasitemia periférica durante o curso da infecção e tratamento, a porcentagem de hemácias infectadas foi mensurada por citometria de fluxo. Os camundongos tratados com CQ apresentaram níveis indetectáveis de parasitos ao longo do período de observação. Em contraste, animais infectados e não tratados desenvolveram um aumento progressivo da parasitemia, sendo que entre os dias 6-8 após a infecção esses apresentaram valores médios de parasitemia entre 5-11% (Fig. 3A), coincidentes com a morte da maioria dos animais deste grupo (oitavo dia de infecção).

Os camundongos infectados e tratados com Ext-Ts também mostraram um aumento gradual nos níveis de parasitemia durante o curso da infecção; porém, a parasitemia média em camundongos tratados com Ext-Ts foram significativamente menores entre os dias 6-8 após a infecção (2-5%) ( $p < 0,01$ ), quando comparada com o grupo infectado e não tratado. Posteriormente, entre 8-10 dias após a infecção a parasitemia do grupo tratado com Ext-Ts permaneceu entre 5-8%, após o qual aumentou consideravelmente ao longo dos próximos 16 dias (Fig. 3A). Pode-se ressaltar que no oitavo dia de infecção o grupo tratado com Ext-Ts exibiu uma parasitemia média de 5,2%, sendo aproximadamente duas vezes menor que a apresentada pelo grupo não tratado (11,2%) (Fig. 3A e B). A redução nos níveis de parasitemia foi também notada através da análise dos esfregaços sanguíneos dos animais, nos quais foram observadas menores proporções de hemácias infectadas, assim como uma menor quantidade de estágios sanguíneos mais desenvolvidos (esquizontes), nos esfregaços dos animais tratados com Ext-Ts quando comparadas com as lâminas dos animais não tratados (Fig. 3C).

### 4.4. Dosagem de lipídeos séricos

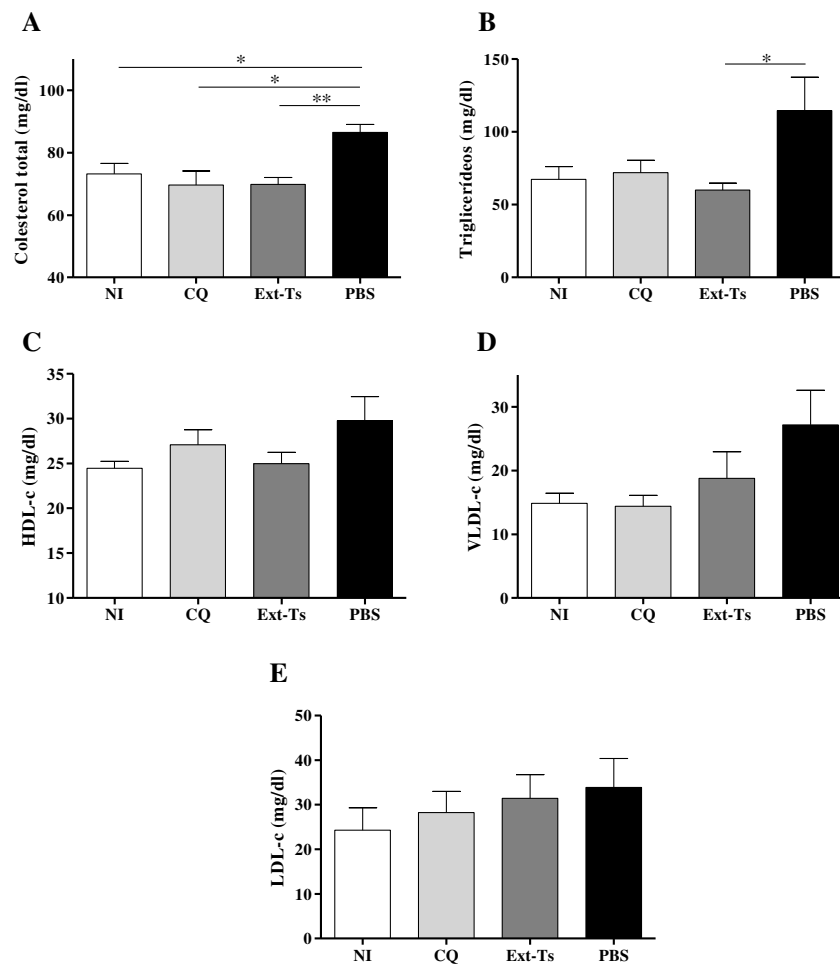
Ao analisar as concentrações de lipídeos séricos observou-se que os animais infectados que não receberam tratamento mostraram altos níveis de colesterol total quando comparados com os grupos não infectado ( $p < 0,05$ ), tratado com CQ ( $p < 0,05$ ) e tratado com Ext-Ts ( $p < 0,01$ ) (Fig. 4A), embora não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de HDL, LDL e VLDL dos grupos estudados (Fig. 4B-D). De forma semelhante, foram detectados níveis significativamente maiores de triglicerídeos em animais infectados não tratados quando comparados com as concentrações desse parâmetro em animais tratados com Ext-Ts ( $p < 0,05$ ), ainda quando comparados com o grupo não infectado e com o grupo tratado com CQ não houve diferenças estatísticas significantes (Fig. 4E).



**Figura 3.** Parasitemia de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts). Amostras de sangue da cauda de camundongos C57BL/6 inoculados com  $5 \times 10^4$  hemácias infectadas e tratados com 100 mg/kg/dia de Ext-Ts (n=10) ou 10 mg/kg/dia de Cloroquina (CQ, n=8) ou veiculo (PBS, n=12) durante 18 dias, foram coletadas e analisadas mediante citometria de fluxo. A: Parasitemia dos animais durante o tempo de observação; B: Histogramas representativos da parasitemia no oitavo dia de infecção e tratamento, mostrando a frequência de infecção das hemácias nesse ponto de tempo; C: Imagens representativas de esfregaços sanguíneos de camundongos tratados (Ext-Ts) ou não tratados (PBS) no oitavo dia de infecção. Setas apontam parasitos em estágio de esquizonte. Amplificação: 100X. Dados são apresentados como média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média nos pontos de tempo indicados e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes, analisados através de Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Asteriscos apontam os períodos de tempo nos quais existiram diferenças estatísticas entre os grupos PBS e Ext-Ts. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

#### 4.5. Análise das alterações histológicas e da deposição de hemozoína no fígado

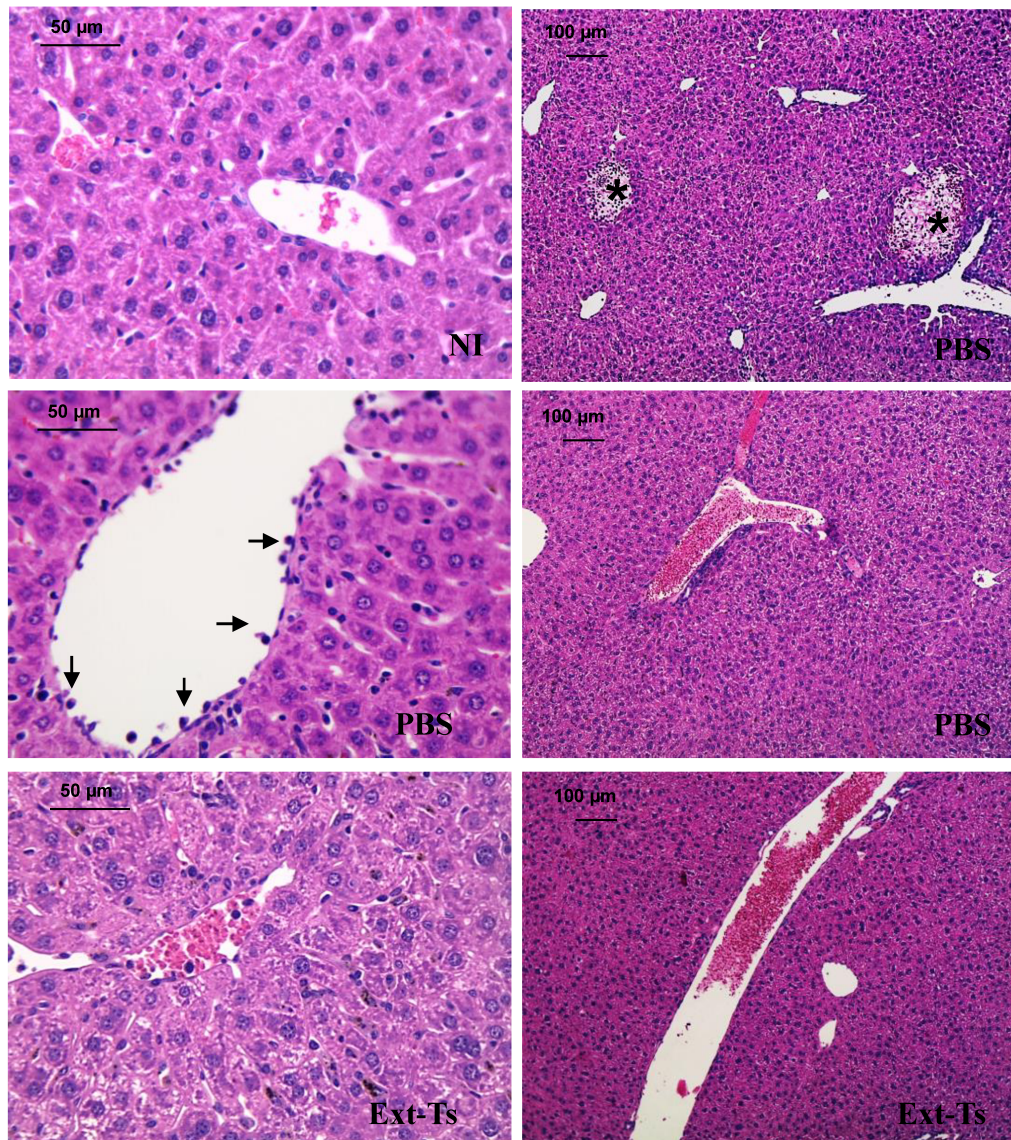
O fígado dos animais infectados com PbA apresentaram vasos sanguíneos congestionados com acentuada citoaderência de leucócitos, os quais com frequência continham pigmento malárico. Foram observados alguns focos de células inflamatórias mononucleadas dispersas, assim como áreas com hemorragia ao longo do parênquima do tecido hepático. Foram encontradas áreas de necrose em duas de cinco lâminas dos animais examinados. Nos camundongos tratados com Ext-Ts as lesões foram menos graves, sendo que nesses grupos foi observada uma menor quantidade de vasos sanguíneos congestionados e citoaderência de leucócitos, assim como um menor número de áreas hemorrágicas (Fig. 5).



**Figura 4. Dosagem de lipídeos nos soros de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts).** Após 7 dias de infecção com PbA e de tratamento com Ext-Ts (n=11), cloroquina (CQ; n=6) ou veículo (PBS; n=11) durante o mesmo período de tempo, os camundongos dos grupos experimentais foram eutanasiados e o soro coletado para dosagem dos níveis de lipídeos. Um grupo não infectado (NI; n=14) foi utilizado como grupo controle. A: Colesterol total; B: Triglicerídeos; C: HDL; D: VLDL; E: LDL. Dados são apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes analisados pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

A hemozoína é um pigmento malárico liberado após a ruptura de hemácias infectadas com *Plasmodium* que pode se acumular nos tecidos e com frequência ser internalizado por macrófagos circulantes ou por macrófagos residentes de tecidos (OLLIARO et al., 2000). Essa deposição do pigmento parece ter efeitos prejudiciais aos tecidos (DEROOST et al., 2013, 2014; GUPTA et al., 2016). Por este motivo, avaliou-se quantitativamente a hemozoína acumulada no fígado dos animais dos grupos experimentais. Utilizando microscopia com filtro de luz polarizada para identificar a hemozoína em cortes histológicos de fígado de camundongos infectados.



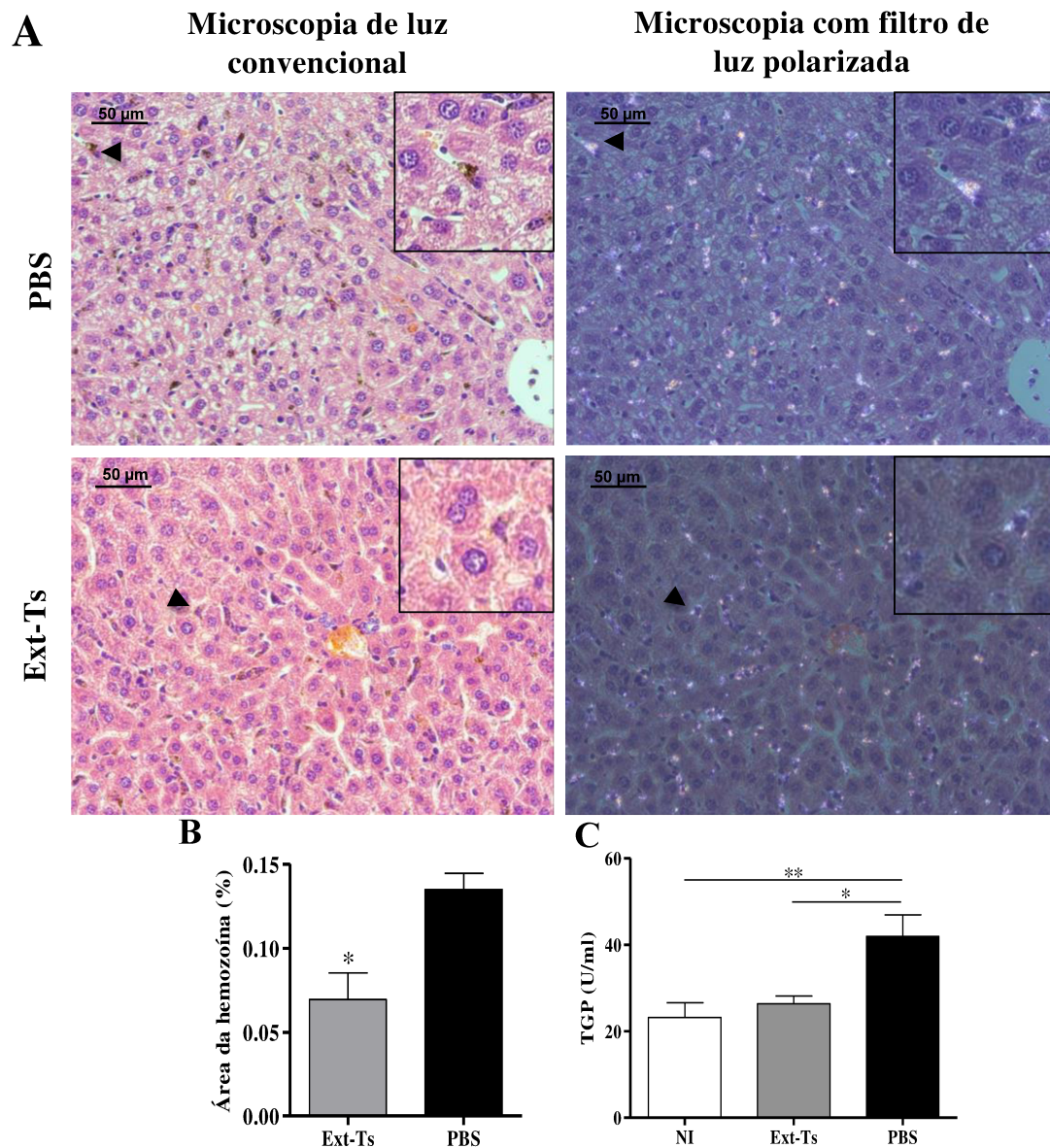


**Figura 5.** Avaliação histológica do fígado de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts). Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado de camundongos, após 7 dias de infecção com PbA e de tratamento com Ext-Ts ou veículo (PBS) durante o mesmo período de tempo. Um grupo não infectado (NI) foi usado como controle. Asteriscos indicam áreas de necrose e setas apontam citoaderência de leucócitos ao endotélio vascular hepático. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Amplificação: 10X (direita) e 40X (esquerda); barras de escala: 100 e 50 µm, respectivamente.

Nas lâminas de animais não tratados observou-se a hemozoína como grandes agregados frequentemente internalizados pelas células de Kupffer, de coloração marrom escuro quando o corte foi corado com H&E, e birrefringente quando foi observado com filtro de luz polarizada (Fig. 6A). Contrariamente, no fígado de animais tratados com Ext-Ts o pigmento foi encontrado em menor quantidade e intensidade (Fig. 6A). Ao quantificar esses agregados nas imagens capturadas, usando o software ImageJ, observou-se que a área ocupada pelo pigmento foi significativamente menor no fígado dos animais tratados com Ext-Ts em comparação com o grupo não tratado ( $p < 0,05$ ) (Fig. 6B). Em relação aos níveis de TGP no soro, observou-se que



animais infectados não tratados apresentaram níveis significativamente maiores dessa transaminase no soro, quando comparado com animais não infectados ( $p<0,01$ ) e infectados e tratados com Ext-Ts ( $p<0,05$ ), os quais mostraram concentrações semelhantes de TGP (Fig. 6C).



**Figura 6. Deposição de hemozoína no fígado e níveis de TGP séricos de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts).** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado de camundongos, após 7 dias de infecção com PbA e de tratamento com Ext-Ts ( $n=6$ ) ou veículo (PBS;  $n=3$ ) durante o mesmo período de tempo. As lâminas foram analisadas usando microscopia de luz convencional e microscopia de luz polarizada para detectar o acúmulo de hemozoína nesse tecido. A: Fotomicrografias representativas da deposição de hemozoína; B: Análise quantitativa da deposição de hemozoína; C: Níveis séricos de TGP. A análise quantitativa foi feita usando o software ImageJ e os dados foram analisados pelo teste t de Student (deposição de hemozoína) e One-way ANOVA (TGP). Cabeças de seta apontam acúmulos de hemozoína mostrados na amplificação. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Amplificação: 20X. NI: controle não infectado. Barras de escala: 50  $\mu$ m. \*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,01$ .

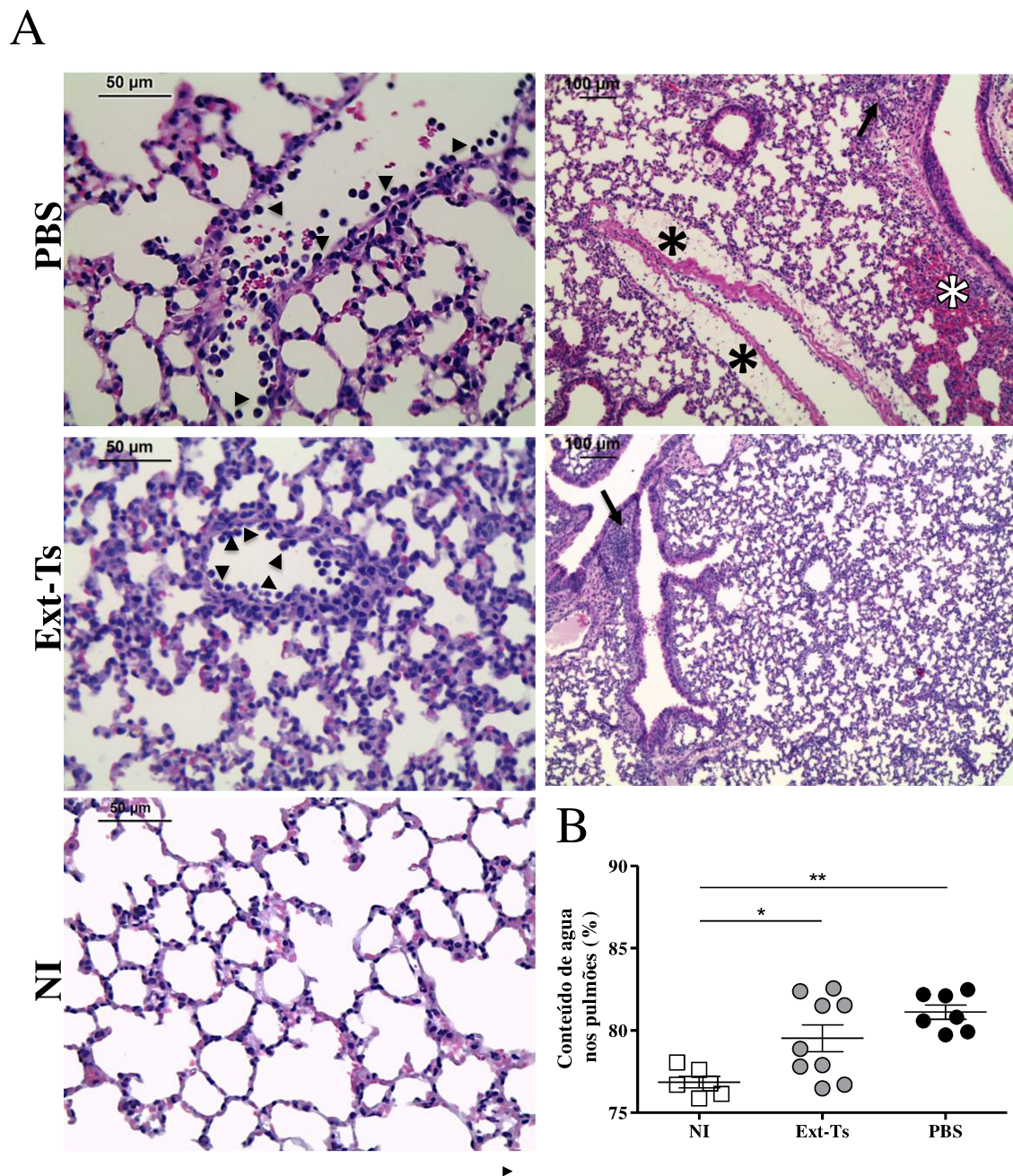
#### **4.6. Análise histológica e avaliação de edema no pulmão**

As lesões nos pulmões dos animais infectados não tratados foram constituídas por infiltrados inflamatórios de células mononucleadas, espessamento das paredes alveolares. Foram também observadas extensas áreas de edema circundando alguns vasos sanguíneos e brônquios. Além disso, foi detectada citoaderência de leucócitos dentro dos vasos sanguíneos pulmonares assim como algumas áreas de hemorragia. Em contraste, em camundongos tratados com Ext-Ts observaram-se infiltrados inflamatórios moderados nos septos pulmonares assim como menores áreas de edema (Fig. 7A).

Uma vez que a presença de edema pulmonar e cerebral é característica comum durante a malária cerebral devido ao aumento da permeabilidade capilar que leva à perda de fluido intravascular (ADHIKARI et al., 2013; SANNI, 2001), avaliou-se o edema pulmonar baseados na mensuração do conteúdo de água nos pulmões. Foi observado que os pulmões de animais infectados não tratados apresentaram conteúdo de água significativamente maior que os pulmões de animais não infectados ( $p < 0,01$ ), comprovando a presença de edema no modelo de infecção utilizado na presente investigação. Da mesma maneira, camundongos infectados e tratados com Ext-Ts também apresentaram aumento do conteúdo de água em comparação aos animais não infectados ( $p < 0,05$ ); porém, esta diferença foi menor quando comparado com animais não tratados (Fig. 7B). Estes resultados sugerem que a administração de Ext-Ts foi capaz de diminuir as alterações histológicas e reduzir mas não evitar a formação de edema nos pulmões de animais infectados com PbA.

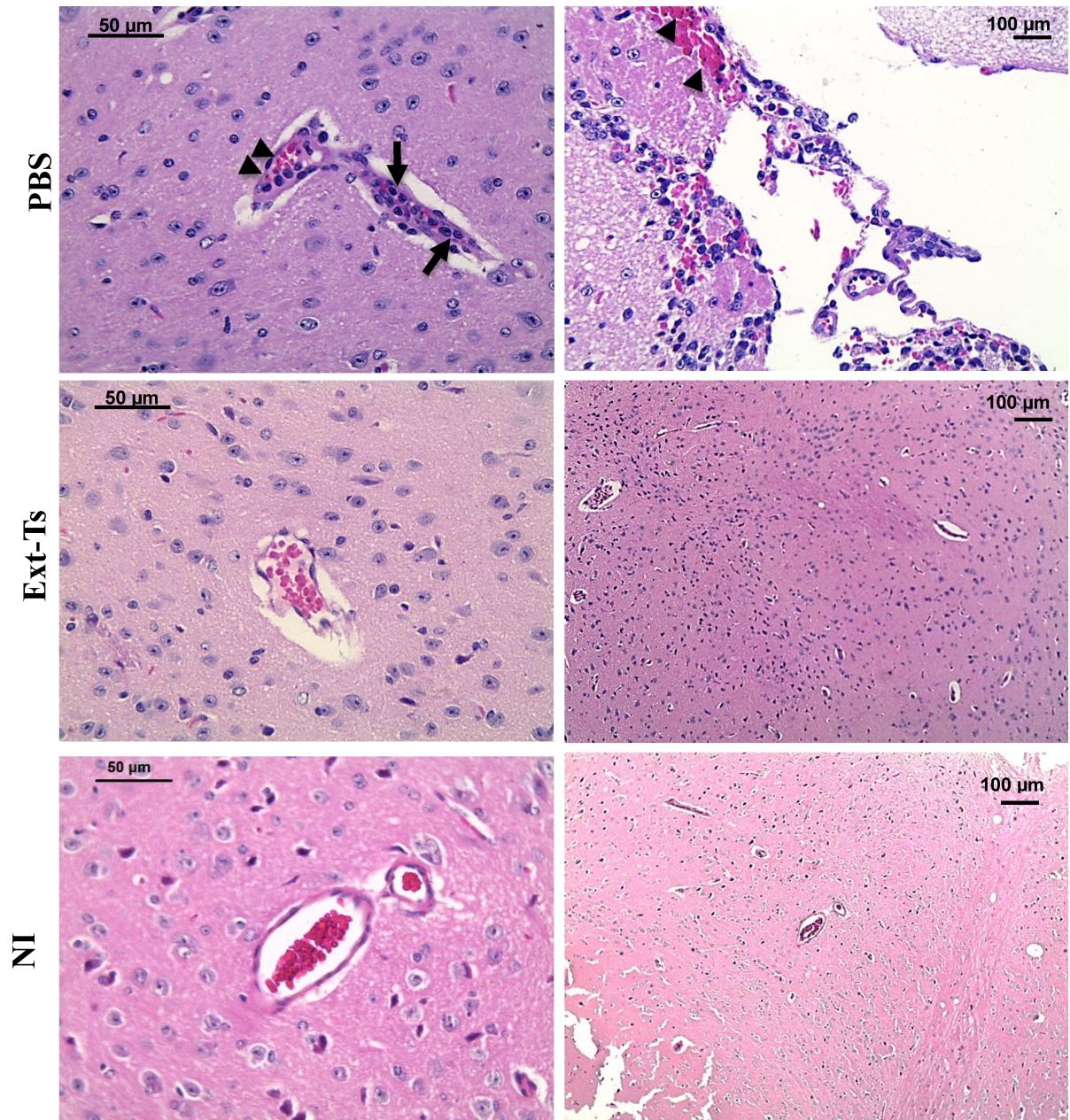
#### **4.7. Análise histológica do cérebro, avaliação da integridade da barreira hematoencefálica e de edema cerebral**

No cérebro de animais infectados e não tratados foi observado um elevado acúmulo de leucócitos e hemácias infectadas na luz da maioria dos vasos sanguíneos analisados no sétimo dia de infecção. Além disso, foram detectadas algumas áreas de hemorragia no parênquima desse órgão (Fig. 8). De forma contrária, as lesões encontradas no cérebro de animais tratados com Ext-Ts foram menos graves, sendo observados alguns vasos sanguíneos congestionados assim como reduzido número de áreas hemorrágicas (Fig. 8).



**Figura 7.** Avaliação da histologia e do conteúdo de água nos pulmões de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts). Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de pulmão de camundongos, após 7 dias de infecção com PbA e de tratamento com Ext-Ts (n=9) ou veículo (PBS; n=7) durante o mesmo período de tempo. Um grupo não infectado (NI; n=6) foi usado como controle visual. A: Histologia do tecido pulmonar dos grupos experimentais. B: Conteúdo de água no tecido pulmonar. Setas: focos de células inflamatórias, setas cabeças: citoaderência de leucócitos, asterisco preto: área de edema, asterisco branco: área de hemorragia. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Amplificação: 10X (direita) e 40X (esquerda); barras de escala: 100 e 50  $\mu$ m, respectivamente. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .



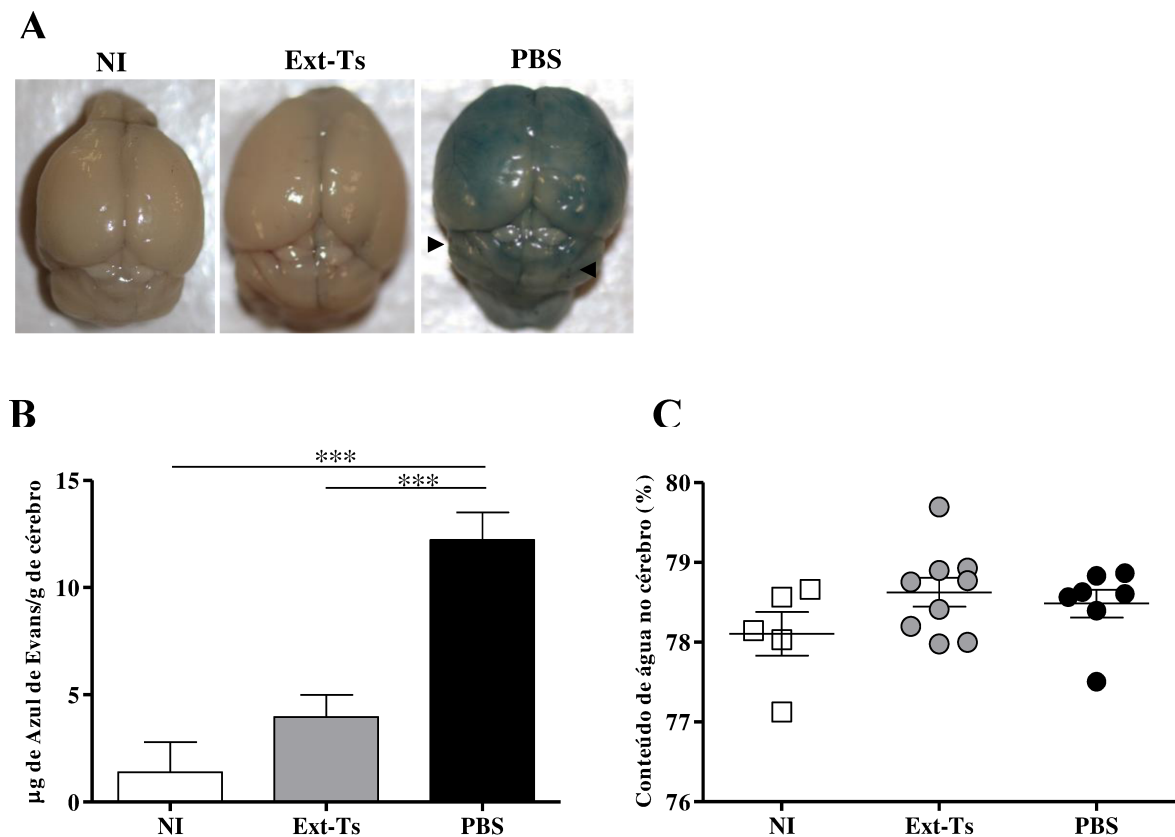


**Figura 8.** Avaliação histológica do cérebro de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts). Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado de camundongos, após 7 dias de infecção com PbA e de tratamento com Ext-Ts ou veículo (PBS) durante o mesmo período de tempo. Um grupo não infectado (NI) foi usado como controle visual. Setas indicam citoaderência de leucócitos ao endotélio vascular, cabeças de seta apontam área de hemorragia e hemácias infectadas. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Amplificação: 10X (direita) e 40X (esquerda); barras de escala: 100 e 50 µm, respectivamente.

A integridade da barreira hematoencefálica foi avaliada mediante a quantificação do extravasamento do corante Azul de Evans no tecido cerebral. Como esperado, animais não infectados não apresentaram comprometimento da integridade da barreira hematoencefálica, sendo que no momento da coleta do cérebro desses camundongos não apresentaram coloração azul. Por outro lado, animais infectados e não tratados apresentaram um notável acúmulo do

corante no tecido cerebral indicando a ruptura da barreira hematoencefálica. De forma contrária, animais infectados que receberam tratamento com Ext-Ts mostraram menor acúmulo do corante em comparação com os animais infectados não tratados (Fig. 9A). Na análise quantitativa do extravasamento do Azul de Evans verificou-se que houve uma menor quantidade do corante em camundongos infectados tratados com Ext-Ts quando comparado com os camundongos infectados não tratados ( $p<0,001$ ) (Fig. 9B).

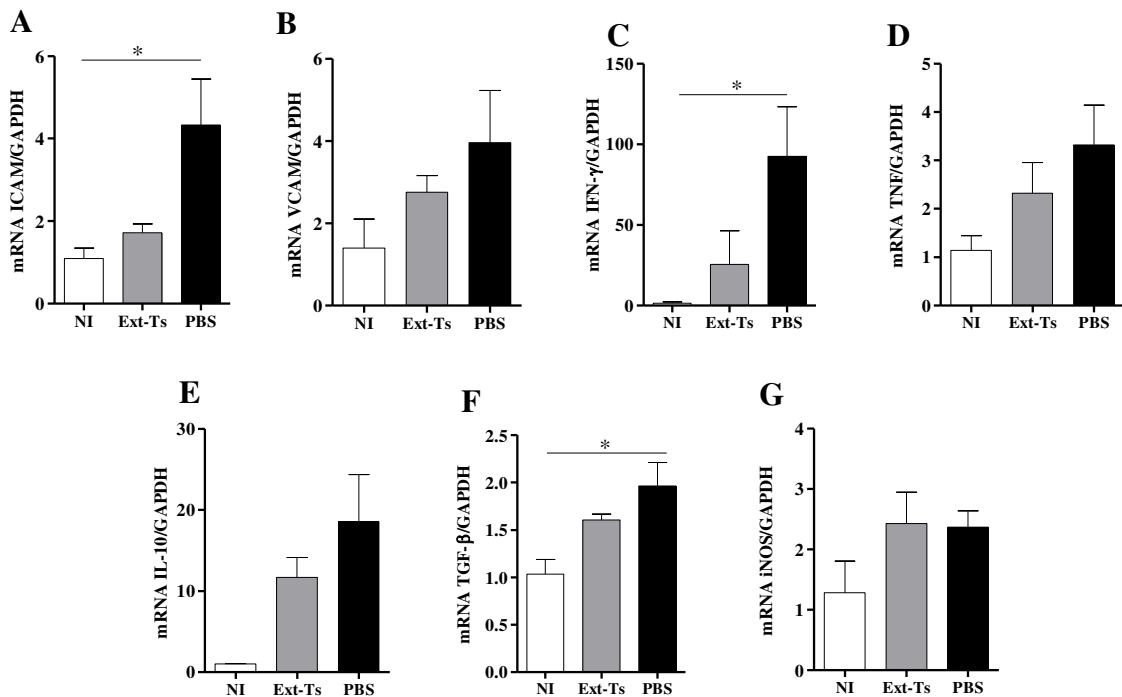
Contrariamente ao esperado, ao analisar o cérebro, observou-se que o conteúdo de água nos animais nos grupos experimentais foi semelhante, sendo que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, sendo independente da infecção e tratamento com Ext-Ts (Fig. 9C).



**Figura 9. Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica e do conteúdo de água em cérebros de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e tratados ou não com extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (Ext-Ts).** Após 7 dias de infecção com PbA e de tratamento com Ext-Ts ( $n=9$ ) ou veículo (PBS;  $n=7$ ) durante o mesmo período de tempo, alguns camundongos C57BL/6 foram submetidos ao teste do Azul de Evans e os demais foram utilizados para a avaliação do conteúdo de água no tecido cerebral. Um grupo não infectado (NI;  $n=5$ ) foi utilizado como grupo controle. A: Análise macroscópica do cérebro mostrando extravasamento do corante Azul de Evans no tecido cerebral dos grupos experimentais, cabeças de seta apontam área de hemorragia; B: Quantificação do Azul de Evans no tecido cerebral; C: Conteúdo de água no cérebro. Dados são apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes analisados pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \*\*\*  $p<0,001$ .

#### 4.8. Análise da expressão de mRNA para IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, TGF- $\beta$ , iNOS, ICAM-1 e VCAM-1 no cérebro

A análise da expressão relativa de mRNA revelou que existe um aumento significativo da expressão de IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e ICAM-1 no cérebro de animais infectados com PbA que não receberam tratamento ( $p < 0,05$ ), em comparação com animais não infectados. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a expressão dessas moléculas entre os grupos não infectado e o grupo infectado tratado com Ext-Ts. Em relação à expressão relativa de mRNA para VCAM-1, TNF e IL-10, observou-se tendência semelhante que para aos parâmetros anteriormente mencionados, porém, sem diferença significativa entre os grupos. Por último, houve uma tendência a aumento da expressão relativa de iNOS nos grupos de animais infectados, mas sem diferença entre os grupos tratados ou não com Ext-Ts (Fig. 10).



**Figura 10. Expressão relativa de mRNA para IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, TGF- $\beta$ , iNOS, ICAM-1 e VCAM-1 no cérebro.** Foi feita extração de mRNA de cérebros de camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com 100mg/kg/dia de Ext-Ts durante 18 dias, este foi transcrito em cDNA e analisado através de qPCR. Um grupo não infectado (NI) foi utilizado como grupo controle. Foi usado um n=3 por cada grupo. A: ICAM-1; B: VCAM-1; C: IFN- $\gamma$ ; D: TNF; E: IL-10; F: TGF- $\beta$ ; G: iNOS. Dados são apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. \*:  $p < 0,05$ .



## 5. DISCUSSÃO

Camundongos C57BL/6 infectados com PbA são susceptíveis ao desenvolvimento de ECM, sucumbindo entre 8-10 dias após apresentarem convulsões, ataxia e coma, com níveis de parasitemia variando entre 15-20%. Em contraste, camundongos BALB/c são resistentes, não desenvolvendo sintomas neurológicos específicos ou dano cerebral, morrendo devido à anemia decorrente dos altos níveis de parasitemia atingidos (~80%) entre três e quatro semanas após a infecção com PbA, superando o tempo médio de mortalidade por ECM (HANUM; HAYANO; KOJIMA, 2003). Na presente investigação, foi demonstrado que a administração de Ext-Ts tem um papel protetor na infecção por PbA em camundongos C57BL/6, uma vez que animais infectados e tratados com Ext-Ts apresentaram sobrevivência prolongada, assim como uma diminuição das alterações neurológicas associadas à malária cerebral experimental, assemelhando-se ao quadro apresentado por animais resistentes.

A anemia constitui uma marcante característica durante a infecção por malária, porém, contrariamente ao esperado, não foram encontradas diferenças significativas no hematócrito dos grupos experimentais no sétimo dia de infecção, tenham sido esses tratados ou não com Ext-Ts. Em estudos realizados com camundongos da linhagem ICR, observou-se uma diminuição do hematócrito após a infecção com  $1 \times 10^7$  hemácias infectadas com PbA (SOMSAK; CHACHIYO, 2015; SOMSAK et al., 2013). Em contraste, e de maneira similar à presente pesquisa, tem sido observado que camundongos C57BL/6 no quinto dia de infecção com  $10^5$  PbA apresentaram valores de hematócrito semelhantes a camundongos saudáveis (BRANT et al., 2014; VAL et al., 2015).

As hemácias e os hepatócitos constituem as células alvo no ciclo evolutivo da malária. Neste trabalho, foi encontrada uma notável diminuição nos níveis de parasitemia nos primeiros 8 dias de infecção quando os camundongos foram tratados com Ext-Ts. Anteriormente, outros extratos fúngicos se mostraram eficientes na redução da parasitemia em modelos murinos. O extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* foi capaz de diminuir a parasitemia e melhorar os índices de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com PbA (VAL et al., 2015). De forma semelhante, o tratamento com extrato aquoso do cogumelo *Ganoderma lucidum* reduziu a parasitemia em camundongos Swiss infectados com *P. berghei* NK65 (OLUBA et al., 2012).

Na fase eritrocítica da infecção, as espécies de *Plasmodium* invadem as hemácias e digerem a hemoglobina por meio da degradação da globina em aminoácidos necessários para o seu metabolismo e liberam a heme, a qual é tóxica para o parasito. Por este motivo, o parasito

realiza a dimerização da heme e a sua cristalização para um pigmento inócuo para ele: a hemozoína (CORONADO; NADOVICH; SPADAFORA, 2014). Após a maturação do parasito para o estágio de esquizonte, ocorre a ruptura da hemácia e a hemozoína contida no vacúolo digestivo é liberada e atinge diferentes órgãos, principalmente o fígado, onde esse pigmento é acumulado, desencadeando uma inflamação local (DEROOST et al., 2013, 2014; GUPTA et al., 2016). Neste sentido, tem sido demonstrada uma correlação positiva entre a deposição de hemozoína e os níveis de parasitemia, sendo que as quantidades de hemozoína aumentam progressivamente durante a infecção (DEROOST et al., 2014). Esses dados estão em concordância com os resultados aqui apresentados, uma vez que foi detectada uma menor deposição do pigmento no fígado assim como uma menor parasitemia periférica em camundongos infectados após a administração de. Além disso, a diminuição das lesões no tecido hepático, caracterizada pela ausência de áreas de necrose e a redução de áreas hemorrágicas, em comparação aos animais controles infectados e não tratados, está em concordância com os menores níveis da enzima TGP observados em camundongos infectados e tratados com Ext-Ts. Sendo que a TGP é um conhecido marcador de dano hepático (KIM et al., 2008), estes dados demonstram os efeitos benéficos do tratamento com Ext-Ts nesse órgão.

Existem hipóteses de possíveis mecanismos biológicos envolvendo alterações lipídicas no hospedeiro e a patogênese da malária (VISSER et al., 2013). Anteriormente, acreditava-se que as espécies do gênero *Plasmodium*, de maneira semelhante a outros parasitos intracelulares, eram incapazes de sintetizar lipídeos necessários para o seu desenvolvimento, necessitando obter os mesmos do hospedeiro (HOLZ, 1977). Estudos transcriptômicos revelaram que a regulação das enzimas do sistema FAS II (sintetase de ácidos graxos de tipo II) é aumentada durante a infecção no estágio pré-eritrocítico (hepático) (TARUN et al., 2008). A expressão de FAS II é essencial para a replicação do parasito neste ponto (antes da passagem para estágios eritrocíticos) uma vez que a atividade dessas e outras enzimas são críticas na formação de merozoítos infectantes. Contudo, apesar desta habilidade para sintetizar ácidos graxos *de novo*, o parasito depende do constante fornecimento de lipídeos pelo hospedeiro, uma vez que a inibição de fontes de colesterol do hospedeiro causa diminuição do conteúdo de colesterol nos merozoítos (ALLARY et al., 2007; ITOE et al., 2014; LINDNER et al., 2014).

No presente estudo foi observado que animais infectados com PbA apresentaram maiores níveis de lipídeos séricos em geral, em comparação a animais não infectados. De maneira específica, foram detectadas concentrações de colesterol total e triglicerídeos significativamente menores em animais infectados e tratados com Ext-Ts, em relação a animais infectados e não tratados, atingindo níveis semelhantes a camundongos não infectados.

Sriwiphat et al. (2015) encontraram a mesma tendência em camundongos ICR infectados com PbA e tratados com extrato aquoso bruto da planta *Andrographis paniculata*. De forma similar, Oluba et al. (2012) associaram o efeito antimalárico do extrato aquoso de *G. lucidum* com uma modulação dos lipídeos séricos e hepáticos, sendo diminuída a concentração de colesterol sérico em comparação com os animais controles infectados e não tratados. Em concordância com os resultados apresentados, Chikezie e Okpara (2012), mostraram que indivíduos infectados com *P. falciparum* apresentaram maiores níveis de colesterol e triglicerídeos em comparação com indivíduos não infectados. Os dados obtidos neste trabalho indicam que, embora não seja o único, a diminuição dos lipídeos séricos poderia se considerar um possível mecanismo que contribuiria para proteção conferida pelo tratamento com Ext-Ts.

A produção de edema pulmonar e cerebral são características comuns na malária grave. Nos pulmões, o extravasamento de líquido dos capilares alveolares para o espaço intersticial tem sido associado com sequestro celular, obstrução microvascular, aumento da permeabilidade capilar e redução da pressão osmótica (KINGSTON; TURNER; DAY, 2014). A presença de edema pulmonar foi evidenciada nos animais infectados no presente estudo, quando analisadas a histologia e o conteúdo de água nos pulmões, independentemente se esses foram tratados ou não com Ext-Ts. Ainda, o tratamento com Ext-Ts não foi capaz de prevenir a formação de edema nesse órgão, embora tenha atenuado a sua intensidade. A patologia pulmonar durante a malária tem sido associada com espessamento das membranas basais do endotélio pulmonar, congestão dos capilares alveolares com leucócitos e hemácias infectadas e não infectadas (AITKEN et al., 2014), deposição de hemozoína nos pulmões, a qual induz a expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF, TGF- $\beta$  e ICAM-1 além de outros marcadores, levando ao recrutamento de células inflamatórias para o local (DEROOST et al., 2013).

Estudos anteriores apontam que o rompimento da barreira hematoencefálica que leva a morte neuronal durante a ECM, é causada pelo recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> e pela disfunção das junções de oclusão endoteliais (BROWN et al., 2001; POH et al., 2014; SWANSON et al., 2016). Outros estudos demonstram a correlação positiva entre o rompimento da barreira hematoencefálica com a patogênese da malária cerebral (BROWN et al., 2001; HUNT et al., 2014; MEDANA; TURNER, 2006). O papel do edema cerebral na patogênese da malária é controverso, sendo o mesmo associado com um aumento no volume do líquido intersticial, que exerce pressão ao redor dos neurônios e células da glia levando à perda de função neuronal e, dependendo da gravidade, ao coma (SANNI, 2001). Na presente investigação, não foram detectadas evidências significativas da produção de edema cerebral nos animais infectados avaliados, baseado no conteúdo de água do órgão. Porém, os animais tratados com Ext-Ts

mantiveram a integridade da barreira hematoencefálica, o que está em concordância com a menor intensidade nas lesões observadas no tecido cerebral.

A infecção por *P. falciparum* e o modelo murino equivalente, a infecção por PbA em camundongos C57BL/6, são caracterizados por uma inflamação exacerbada que leva ao aumento da parasitemia e a imunopatologia, sendo que em ambos a inflamação e as alterações metabólicas contribuem para os sintomas que podem ser fatais (DEROOST et al., 2016). Diversos estudos usando camundongos *knockout* tem contribuído para o esclarecimento de quais são os mediadores químicos envolvidos na imunopatologia ocorrida nessa doença (FAVRE; RYFFEL; RUDIN, 1999; FAVRE et al., 1999; RUDIN; FAVRE; BORDMANN, 1997; RUDIN et al., 1997).

IFN- $\gamma$  é uma citocinas pró-inflamatória altamente expressa durante a infecção por PbA, induzindo uma variedade de efeitos no tecido cerebral, tais como: ativação do endotélio vascular, recrutamento de células T CD8<sup>+</sup>, aumento da permeabilidade e expressão de moléculas de adesão (HUNT et al., 2014). Camundongos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> são resistentes à malária cerebral experimental, sendo que apresentam proteção da barreira hematoencefálica assim como menores alterações histopatológicas do que camundongos controles os quais apresentam comprometimento da barreira hematoencefálica, assim como hemorragias e sequestro de leucócitos para endotélio vascular cerebral (SWANSON et al., 2016; HUNT et al., 2014; RUDIN; FAVRE; BORDMANN, 1997).

A via de sinalização de IFN- $\gamma$  tem início na ativação de JAK1 e JAK2 no receptor de IFN- $\gamma$ , que leva ao recrutamento, ativação e homodimerização de STAT1. Este processo desencadeia a transcrição e expressão de várias moléculas associadas com a patologia da malária, principalmente da molécula de adesão ICAM-1 (SCHRODER et al., 2004). O aumento na regulação de ICAM-1 e óxido nítrico (NO) é também dependente da produção de TNF uma vez que camundongos TNF- $\alpha/\beta$ <sup>-/-</sup> são resistentes à ECM, indicando que a produção de ambas citocinas é chave no desenvolvimento da patologia cerebral (RUDIN et al., 1997).

Apesar de que VCAM-1, CD36, P-Selectina e outros receptores e moléculas de adesão estarem associados com a patologia na malária cerebral e na ECM (DE SOUZA et al., 2010), ICAM-1 tem sido o principal fator associado a citoaderência durante a malária grave, uma vez que quando aumentada sua expressão, o prognóstico da doença é agravado. Estudos em camundongos deficientes em ICAM-1 revelaram que a parasitemia e a resposta imune desses animais é semelhante à apresentada por camundongos controles. A ausência dessa molécula de adesão contribuiu para proteção da barreira hematoencefálica, menor citoaderência em vasos sanguíneos cerebrais e alveolares, além de aumentar significativamente a sobrevivência de

animais infectados com PbA (FAVRE et al., 1999). Neste sentido, o sequestro de hemácias infectadas dentro da microvasculatura é uma característica marcante na malária cerebral, sendo um possível mecanismo para evitar a eliminação das mesmas no baço (DEL PORTILLO et al., 2012). Na ECM, essa citoaderência é caracterizada principalmente pelo sequestro de leucócitos e plaquetas no endotélio vascular de diferentes órgãos, além da adesão de hemácias infectadas em células endoteliais pulmonares e cerebrais (EL-ASSAAD et al., 2013; HEARN et al., 2000; SUN et al., 2003). Nossos resultados sugerem que a menor expressão de ICAM-1 no tecido cerebral de animais infectados e tratados com Ext-Ts e consequentemente menor citoaderência, possa ser um mecanismo de proteção induzido pelo tratamento com o extrato.

Tanto IL-10 quanto TGF- $\beta$  são citocinas com papéis reguladores durante a malária cerebral. Elevadas concentrações de IL-10 e TGF- $\beta$  tem sido encontradas no soro e no cérebro de pacientes com malária cerebral e malária grave (ARMAH et al., 2005; BROWN et al., 1999; DAY et al., 1999; LYKE et al., 2004; PEYRON et al., 1994). Além disso, a liberação de TGF- $\beta$  pelos grânulos- $\alpha$  das plaquetas na microvasculatura cerebral é considerado um dos fatores causadores de apoptose no endotélio vascular durante a doença (WASSMER et al., 2006). Observamos maior expressão de TGF- $\beta$  no cérebro dos animais infectados com PbA em comparação com os animais não infectados, principalmente os animais infectados e não tratados, assim como de IL-10, apesar de não ser estatisticamente significativa, podendo refletir um balanço em relação a resposta altamente inflamatória encontrada nesses animais, como acontece em infecção por outros parasitos do filo apicomplexa (KHAN et al., 1995).

O NO é uma molécula produzida a partir da arginina numa reação catalisada pelas enzimas óxido nítrico-sintases (NOS). Essa molécula cumpre com um papel citoprotetor e citotóxico na malária, uma vez que tem a capacidade de eliminar o parasito como parte da imunidade inata, e pode atravessar facilmente a barreira hematoencefálica, por ser uma molécula gasosa, causando efeitos prejudiciais aos neurônios (HORA et al., 2016). Altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias levam a expressão aumentada de iNOS no cérebro e consequente maior produção de NO, aumentando as manifestações clínicas como convulsões, coma e morte (MANEERAT et al., 2000).

Esses dados são semelhantes aos resultados obtidos na presente pesquisa, sendo que os animais tratados com Ext-Ts apresentaram maior resistência à infecção, uma expressão de IFN- $\gamma$  e ICAM-1 semelhante aos animais não infectados, assim como uma tendência para a redução da expressão relativa de TNF e IL-10 no tecido cerebral, em comparação à expressão dessas moléculas em animais não tratados. Essa imunossupressão modula a resposta exacerbada



frequentemente apresentada durante a infecção, que é a responsável pela patologia durante a ECM.

Os fungos são produtores de uma ampla variedade de metabólitos secundários uma vez que, de maneira semelhante às plantas, seus principais mecanismos de defesa frente a predadores são químicos. O gênero *Trichoderma* é um grande produtor de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. Dentre essas moléculas, as mais interessantes são os *peptaibols* ou peptaibióticos (DRUZHININA et al., 2011; DUCLOHIER, 2007). O *peptaibol* mais conhecido é a alameticina, a qual é produzida pelo fungo *T. viride*, devido à sua capacidade de formar canais iônicos dependentes de voltagem em membranas biológicas (TIELEMAN; BERENDSEN; SANSOM, 1999). O micélio de *T. viride* tem mostrado propriedade nematófaga, sendo que diminui a infectividade de ovos de *Toxocara canis* (DE FILHO et al., 2017). A partir de *T. longibrachiatum* tem se isolado *peptaibols* tais como as longibrachinas, com propriedades antifúngica e antibacteriana, assim como atividade tóxica contra larvas de *Calliphora vomitoria* (MOHAMED-BENKADA et al., 2016). Além disso, Trichogina GA IV, um lipopeptaibol isolado de *T. longibrachiatum*, possui atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* e outras bactérias Gram-positivas (DE ZOTTI et al., 2012).

Em relação ao *T. stromaticum*, estudos anteriores identificaram em culturas desse fungo, os *peptaibols* chamados trichostromaticina A-E (TSM A-E) e trichocompactina-XII (TCT XII). Acredita-se que essas moléculas sejam produzidas como mecanismo de defesa contra patógenos de plantas (DEGENKOLB et al., 2006). Então, é possível que a produção dessas substâncias contribua para a atividade antimalárica demonstrada na presente pesquisa, talvez de maneira sinérgica com outros compostos imunomoduladores presentes no extrato de *T. stromaticum*. Porém, estudos adicionais são necessários para a elucidação completa desse mecanismo.

Em resumo, os resultados obtidos na presente investigação indicam que o tratamento com Ext-Ts é capaz de reduzir fortemente a manifestação de alterações neurológicas associadas a ECM, diminuir os níveis de parasitemia no início da infecção e aumentar significativamente a sobrevivência dos animais infectados com PbA. Além disso, os camundongos tratados com Ext-Ts apresentaram diminuição das concentrações de colesterol, triglicerídeos e TGP séricos, redução na deposição de hemozoína no fígado, proteção da barreira hematoencefálica, atenuação do edema pulmonar assim como menor citoaderência e inflamação nos tecidos avaliados. Ainda a expressão de IFN- $\gamma$  e ICAM-1 no cérebro se manteve nos níveis dos animais não infectados. Coletivamente, esses resultados sugerem que Ext-Ts é uma potencial fonte de compostos antimaláricos e/ou imunomoduladores que poderiam melhorar o tratamento atual contra a doença, uma vez que há um aumento da resistência aos derivados da artemisinina.

## CONCLUSÕES

- O tratamento com Ext-Ts de camundongos C57BL/6 após a infecção com PbA diminuiu a parasitemia nos primeiros dias de infecção e aumentou significativamente a sobrevivência dos animais infectados.
- O tratamento com Ext-Ts foi capaz de prevenir a manifestação de alterações neurológicas associadas a malária cerebral experimental, provavelmente através da manutenção de baixos níveis de expressão de IFN- $\gamma$  e ICAM-1 no cérebro, preservando a integridade da barreira hematoencefálica e consequentemente diminuindo a citoaderência de células inflamatórias e hemácias aos vasos cerebrais.
- Na periferia, o tratamento de camundongos com Ext-Ts diminuiu as concentrações de colesterol, triglicerídeos e TGP séricos, reduziu a deposição de hemozoína no fígado e atenuou parcialmente o edema pulmonar assim como diminuiu a citoaderência nesses órgãos, contribuindo para a maior sobrevivência dos animais.
- Ext-Ts é uma potencial fonte de compostos antimaláricos e/ou imunomoduladores que poderiam melhorar o tratamento atual contra a doença. Porém, são necessários estudos adicionais para identificar as moléculas responsáveis por esses efeitos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, B. et al. Factors associated with cerebral malaria. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 44, n. 6, p. 941-949, 2013.
- AGNANDJI, S. T. et al. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 24, p. 2284-2295, 2012.
- AITKEN, E. et al. Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2014.
- ALLARY, M. et al. Scavenging of the cofactor lipoate is essential for the survival of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1331-1344, 2007.
- ALVAREZ, A.; LANDAU, I.; BACCAM, D. *Plasmodium vinckei petteri*: algunos aspectos de su esporogonia y esquizogonia exoeritrocitaria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 6, p. 421-426, 1991.
- ALVES, M; LIMA, V.; RANGEL, O. Malária congênita no município de Leme, SP. **Jornal de Pediatria**, v. 71 n. 3, p. 163-165, 1995.
- ALVES-FILHO, E. R. et al. The biocontrol fungus *Trichoderma stromaticum* downregulates respiratory burst and nitric oxide in phagocytes and IFN-gamma and IL-10. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, v. 74, n. 14, p. 943-958, 2011.
- AMINO, R. et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature medicine**, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.
- ARMAH, H. et al. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, n. 1, p. 123-131, 2005.
- AWAAD, A. S. et al. Anti-leishmanial activities of extracts and isolated compounds from *Drechslera rostrata* and *Eurotium tonopholium*. **Phytotherapy research**, v. 28, n. 5, p. 774-780, 2014.
- BARATA, L.; ANDRIGUETTI, M. Surto de malária induzida entre usuários de drogas injetáveis. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 1, p. 9-14, 1993.
- BARTLEY, P. M. et al. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* *in vivo*. **Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 421-32, 2006.
- BASTOS, C. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 50-54, 1996.
- BERENDT, AR; TUMER, G.; NEWBOLD, CI. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. **Parasitology Today**, v. 10, n. 10, p. 412-414, 1994.

- BERO, J. et al. *In vivo* antimalarial activity of *Keetia leucantha* twigs extracts and *in vitro* antiplasmodial effect of their constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 176-183, 2013.
- BEUTLER, E. The hemolytic effect of primaquine and related compounds: a review. **Blood**, v. 14, n. 2, p. 103-39, 1959.
- BOGITSH, BJ; CARTER, CE; OELTMANN, TN. Human parasitology. Boston :Academic Press, 2013.
- BRANT et al. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Immune Response Profile and Development of Pathology during *Plasmodium berghei* ANKA Infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 8, p. 3127-3140, 2014.
- BROTMAN, Y; KAPUGANTI, JG; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v. 20, n9, p. R391, 2010.
- BROWN, H. et al. Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 25, n. 4, p. 331-340, 1999.
- BROWN, H. et al. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, p. 1742-1746, 1999.
- BROWN, H. et al. Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 3-4, p. 207-213, 2001.
- BUFFET, P. et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 381-392, 2011.
- CARROLL, R. W. et al. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. **PLOS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13124, 2010.
- CARVALHO, L. H. et al. IL-4-secreting CD4<sup>+</sup> T cells are crucial to the development of CD8<sup>+</sup> T-cell responses against malaria liver stages. **Nature Medicine**, v. 8, n. 2, p. 166-170, 2002.
- CHAKRAVARTY, S. et al. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. **Nature Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1035-1041, 2007.
- CHIKEZIE, PC; OKPARA, RT. Serum lipid profile and hepatic dysfunction in moderate *Plasmodium falciparum* infection. **Public Health and Epidemiology**, v. 5, n. 9, p. 379-384, 2012.
- CHITNIS, C. Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion. **Current Opinion in Hematology**, v. 8, n. 2, p. 85-91, 2001.
- CLARK; ROCKETT. The cytokine theory of human cerebral malaria. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 10, n. 10, p. 410-2, 1994.
- COMBES, V. et al. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 541-546, 2006.

CORONADO, L. M.; NADOVICH, C. T.; SPADAFORA, C. Malarial hemozoin: From target to tool. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 6, p. 2032-2041, 2014.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 5, 2010.

CRAIG, A.; SCHERF, A. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 129-143, 2001.

DAVIS, I. C. et al. Nucleotide-mediated inhibition of alveolar fluid clearance in BALB/c mice after respiratory syncytial virus infection. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 286, n. 1, p. L112-L120, 2004.

DAY, N. P. et al. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 4, p. 1288-1297, 1999.

DE FILHO, F. et al. *Trichoderma virens* as a biocontrol of *Toxocara canis*: *In vivo* evaluation. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2017.

DE SOUZA, J. B. et al. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. **Parasitology**, v. 137, n. 5, p. 755-72, 2010.

DE ZOTTI, M. et al. Antimicrobial lipopeptaibol trichogin GA IV: role of the three Aib residues on conformation and bioactivity. **Amino Acids**, v. 43, n. 4, p. 1761-1777, 2012.

DEGENKOLB, T; BERG, A; GAMS, W. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. **Journal of Peptide Science**, v. 9, n. 11-12, p. 666-678, 2003.

DEGENKOLB, T. et al. Peptaibiomics: Screening for Polypeptide Antibiotics (Peptaibiotics) from Plant-Protective *Trichoderma* Species. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, n. 6, p. 593-610, 2006.

DEGENKOLB, T. et al. The Production of Multiple Small Peptaibol Families by Single 14-Module Peptide Synthetases in *Trichoderma/Hypocrea*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 3, p. 499-535, 2012.

DEL PORTILLO, H. A. et al. The role of the spleen in malaria. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 343-355, 2012.

DEROOST, K. et al. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 48, n. 5, p. 589-600, 2013.

DEROOST, K. et al. Hemozoin induces hepatic inflammation in mice and is differentially associated with liver pathology depending on the *Plasmodium* strain. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113519, 2014.

DEROOST, K. et al. The immunological balance between host and parasite in malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 2, p. 208-257, 2016.

DONDORP, A. M. et al. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 455-467, 2009.

DRUZHININA, I. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.

DUCLOHIER, H. Peptaibiotics and peptaibols: an alternative to classical antibiotics? **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 6, p. 1023-1026, 2007.

EL-ASSAAD, F. et al. Cytoadherence of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells to murine brain and lung microvascular endothelial cells *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 11, p. 3984-3991, 2013.

FAVRE, N; RYFFEL, B; RUDIN, W. The development of murine cerebral malaria does not require nitric oxide production. **Parasitology**, v. 18 n. 2, p. 135-138, 1999.

FAVRE, N. et al. Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 12, p. 961-968, 1999.

FERREIRA, M. U.; ZILVERSMIT, M.; WUNDERLICH, G. Origins and evolution of antigenic diversity in malaria parasites. **Current Molecular Medicine**, v. 7, n. 6, p. 588-602, 2007.

FLANNERY, E. L.; CHATTERJEE, A. K.; WINZELER, E. A. Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 849-862, 2014.

FLEMING. Penicillin. **British Medical Journal**, v. 2, n. 4207, p. 282-283, 1941.

FONAGER, J. et al. Reduced CD36-dependent tissue sequestration of *Plasmodium*-infected erythrocytes is detrimental to malaria parasite growth *in vivo*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 1, p. 93-107, 2012.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FRITA, R. et al. In Vivo Hemozoin Kinetics after Clearance of *Plasmodium berghei* Infection in Mice. **Malaria Research and Treatment**, v. 2012, p. 373086, 2012.

GOLDGOF, G. et al. Comparative chemical genomics reveal that the spiroindolone antimalarial KAE609 (Cipargamin) is a P-type ATPase inhibitor. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27806, 2016.

GROBUSCH, M.; KREMSNER, P. Uncomplicated Malaria. In: SULLIVAN, D. J.; KRISHNA, S. (Eds.). Berlin: Springer: **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 2005. p. 81-104.

GUERRA, C. A. et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e774, 2010.

GUPTA, P. et al. Tissue-Resident CD169(+) Macrophages Form a Crucial Front Line against *Plasmodium* Infection. **Cell Reports**, v. 16, n. 6, p. 1749-1761, 2016.

HAJ-YASEIN, N. N. et al. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 43, p. 17815-17820, 2011.

HANUM, S. P.; HAYANO, M.; KOJIMA, S. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. **International Immunology**, v. 15, n. 5, p. 633-640, 2003.

HARBACH, R. E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. **Bulletin of Entomological Research**, v. 94, n. 6, p. 537-53, 2004.

HEARN, J. et al. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5364-76, 2000.

HIGGINBOTHAM, S. J. et al. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophyte taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73192, 2013.

HOLZ, G. G. Lipids and the malarial parasite. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 55, n. 2-3, p. 237-248, 1977.

HORA, R. et al. Cerebral malaria--clinical manifestations and pathogenesis. **Metabolic Brain Disease**, v. 31, n. 2, p. 225-237, 2016.

HUNT, N. et al. Cerebral malaria: gamma-interferon redux. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 113, 2014.

IDRO, R. et al. Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. **Pediatric Research**, v. 68, n. 4, p. 267-274, 2010.

ITOE, M. A. et al. Host Cell Phosphatidylcholine Is a Key Mediator of Malaria Parasite Survival during Liver Stage Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 16, n. 6, p. 778-786, 2014.

JEAN, P. et al. Tafenoquine treatment of *Plasmodium vivax* malaria: suggestive evidence that CYP2D6 reduced metabolism is not associated with relapse in the Phase 2b DETECTIVE trial. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 97, 2016.

KAZMIN, D. et al. Systems analysis of protective immune responses to RTS,S malaria vaccination in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2017.

KELLER, N.; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937-947, 2005.

KHAN, I.; MATSUURA, T.; KASPER, L. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. **Parasite Immunology**, v. 17, n. 4, p. 185-195, 1995.

KILLICK-KENDRICK, R. Taxonomy, Zoogeography and Evolution. In: KILLICK-KENDRICK, R.; PETERS, W. (Eds.). **Rodent malaria**, Academic Press: New York, London, San Francisco, 1978. p. 1-52

KIM, W. R. et al. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. **Hepatology**, v. 47, n. 4, p. 1363-1370, 2008.

KINGSTON, H.; TURNER, G.; DAY, N. Lung Involvement in Malaria. In: HOMMEL, M.; KREMSNER, P. G. (Eds.) **Encyclopedia of Malaria**. Springer: New York, 2014. p. 1-12.

KRAUSE, C; KIRSCHBAUM, J; BRÜCKNER, H. Peptaibiotics: an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS. **Amino Acids**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 2006.

KYAW, M. P. et al. Reduced susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in southern Myanmar. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. e57689, 2013.

KÜCK, U.; BLOEMENDAL, S.; TEICHERT, I. Putting Fungi to Work: Harvesting a Cornucopia of Drugs, Toxins, and Antibiotics. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1003950, 2014.

LAMB, T. J. et al. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 6, p. 1-22, 2006.

LEE, A. H.; FIDOCK, D. A. Evidence of a Mild Mutator Phenotype in Cambodian *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0154166, 2016.

LEVESQUE, M. et al. Nitric Oxide Synthase Type 2 Promoter Polymorphisms, Nitric Oxide Production, and Disease Severity in Tanzanian Children with Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 6, p. 1994-2002, 1999.

LINDNER, S. E. et al. Enzymes involved in plastid-targeted phosphatidic acid synthesis are essential for *Plasmodium yoelii* liver-stage development. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 679-693, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.



- LOOAREESUWAN, S. et al. Do patients with cerebral malaria have cerebral oedema? A computed tomography study. **Lancet**, v. 1, n. 8322, p. 434-437, 1983.
- LYKE, K. et al. Serum Levels of the Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 Beta (IL-1 ), IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12(p70) in Malian Children with Severe *Plasmodium falciparum* Malaria and Matched Uncomplicated Malaria or Healthy Controls. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5630-5637, 2004.
- MANAENKO, A. et al. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 206-210, 2011.
- MANEERAT, Y. et al. Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. **Histopathology**, v. 37, n. 3, p. 269-277, 2000.
- MARSH, KINYANJUI. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 1-2, p. 51-60, 2006.
- MEDANA, I. M.; TURNER, G. D. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 555-568, 2006.
- MEJIA, GA et al. Malaria in a liver transplant recipient: a case report. **Transplantation Proceedings**, 2006.
- MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 156-167, 2013.
- MOHAMED-BENKADA, M. et al. Identification and Biological Activities of Long-Chain Peptaibols Produced by a Marine-Derived Strain of *Trichoderma longibrachiatum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 5, p. 521-530, 2016.
- MUNGAI, M; TEGTMEIER, G; CHAMBERLAND, M. Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. **The New England Journal of Medicine**, 2001.
- NEWTON, C. R.; HIEN, T. T.; WHITE, N. Cerebral malaria. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 69, n. 4, p. 433-441, 2000.
- NOEDL, H.; WONGSRICHANALAI, C.; WERNSDORFER, W. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 4, p. 175-181. p. 175-181, 2003.
- OLLIARO, P. et al. Phagocytosis of hemozoin (native and synthetic malaria pigment), and *Plasmodium falciparum* intraerythrocyte-stage parasites by human and mouse phagocytes. **Ultrastructural Pathology**, v. 24, n. 1, p. 9-13, 2000.
- OLUBA, O. M. et al. Modulation of Lipoprotein Cholesterol Levels in *Plasmodium berghei* Malarial Infection by Crude Aqueous Extract of *Ganoderma lucidum*. **Cholesterol**, v. 2012, p. 536396, 2012.

- PENET, M.-F. F. et al. Imaging experimental cerebral malaria *in vivo*: significant role of ischemic brain edema. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 32, p. 7352-7358, 2005.
- PEYRON, F. et al. High levels of circulating IL-10 in human malaria. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 95, n. 2, p. 300-303, 1994.
- POH, C. M. et al. Damage to the blood-brain barrier during experimental cerebral malaria results from synergistic effects of CD8<sup>+</sup> T cells with different specificities. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 11, p. 4854-4864, 2014.
- POLDER, T. W. et al. Ultrastructural changes in the blood-brain barrier of mice infected with *Plasmodium berghei*. **Acta Leidensia**, v. 60, n. 2, p. 31-46, 1992.
- POMELLA, A.; SOUZA, D. J.; NIELLA, GR. *Trichoderma stromaticum* for management of witch's broom of cacao in Brazil. In: VINCENT, C; GOETTEL, M; LAZAROVITS, G. (Eds). **Biological Control: A Global Perspective : Case Studies from Around the World**, CAB International: Wallingford, 2007. p. 210-217.
- RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 168-178, 2013.
- RODRIGUES-DA-SILVA, R. N. et al. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 154-162, 2014.
- ROTTMANN, M. et al. Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. **Science**, v. 329, n. 5996, p. 1175-1180, 2010.
- RUDIN, W. et al. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor-alpha/beta-deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. **The American Journal of Pathology**, v. 150, n. 1, p. 257-266, 1997.
- RUDIN, W.; FAVRE, N.; BORDMANN, G. Interferon- $\gamma$  is essential for the development of cerebral malaria. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 4, p. 810-815, 1997.
- SAMUELS, G. J. et al. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. **Mycological Research**, v. 104, n. 6, p. 760-764, 2000.
- SANNI, L. The role of cerebral oedema in the pathogenesis of cerebral malaria. **Redox report**, v. 6, n. 3, p. 137-142, 2001.
- SANOGO, S. et al. Production and Germination of Conidia of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of *Crinipellis perniciosus* on Cacao. **Phytopathology**, v. 92, n. 10, p. 1032-1037, 2002.
- SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.
- SHANKS, D.; WHITE, N. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 10, p. 900-906, 2013.

SHIKANI, H. et al. Cerebral Malaria We Have Come a Long Way. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 5, p. 1484-1492, 2012.

SICILIANO, G.; ALANO, P. Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent *Plasmodium* in fundamental and applied research. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 391, 2015.

SILVA, N. M. et al. *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 167-177, 2010.

SMITH, J. et al. Decoding the language of var genes and *Plasmodium falciparum* sequestration. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 11, p. 538-545, 2001.

SOMSAK, V. et al. Protection of renal function by green tea extract during *Plasmodium berghei* infection. **Parasitology International**, v. 62, n. 6, p. 548-551, 2013.

SOMSAK, V.; CHACHIYO, S. Anti-hemolysis of Aqueous Crude Extract of Siamese Neem Tree (*Azadirachta indica*) during *Plasmodium berghei* Infection in Mice. **Malaria Control & Elimination**, v. 4, n. 1, 2015.

SRIWIPHAT, S. et al. Modulation of total cholesterol and triglyceride in *Plasmodium berghei* infected mice by aqueous crude extract of *Andrographis paniculata*. **Journal of Health Research**, v. 29, n. 2, p. 109-114, 2015.

STEPHENS, R.; CULLETON, R.; LAMB, T. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 73-82, 2012.

STRAIMER, J. et al. Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. **Science**, v. 347, n. 6220, p. 428-431, 2015.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, p. 1287, 2006.

SUN, G. et al. Inhibition of platelet adherence to brain microvasculature protects against severe *Plasmodium berghei* malaria. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6553–6561, 2003.

SWANSON, P. A. et al. CD8+ T Cells Induce Fatal Brainstem Pathology during Cerebral Malaria via Luminal Antigen-Specific Engagement of Brain Vasculature. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 12, p. e1006022, 2016.

TARUN, A. S. et al. A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 1, p. 305-310, 2008.

TIELEMAN, D.; BERENDSEN, H.; SANSOM, M. An alamethicin channel in a lipid bilayer: molecular dynamics simulations. **Biophysical Journal**, 1999.

TORRE, D. et al. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, p. 348-351, 2002.

URBAN, B. C. et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**, v. 400, n. 6739, p. 73-77, 1999.

VAL, C. H. et al. Effect of mushroom *Agaricus blazei* on immune response and development of experimental cerebral malaria. **Malaria Journal**, v. 14, p. 311, 2015.

VISSER, B. J. et al. Serum lipids and lipoproteins in malaria-a systematic review and meta-analysis. **Malaria Journal**, v. 12, p. 442, 2013.

WAMMES, L. J. et al. Asymptomatic plasmodial infection is associated with increased tumor necrosis factor receptor II-expressing regulatory T cells and suppressed type 2 immune responses. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 10, p. 1590-1599, 2013.

WARD, G.; MILLER, L.; DVORAK, J. The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes. **Journal of Cell Science**, v. 106, n. 1, p. 237-248, 1993.

WASSMER, S. C. et al. TGF-beta1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 2, p. 1180-1184, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe and complicated malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 1-65, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. S1-88, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe malaria. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19 Suppl 1, s. 1, p. 7-131, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of malaria**. 3. ed. Geneve: World Health Organization, 2015. p. 316

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2016**. Geneve: World Health Organization, 2016.

## 7. ANEXOS

**Tabela 3.** Análise do escore de morbidade referente à Figura 1, por meio do Pós-teste de Bonferroni.

PBS vs 50 mg/kg (10 d) Ext-Ts		Média				
Dias pós-infecção	PBS	50 mg/kg (10 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
6,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
7,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
8,000	2,000	0,2000	-1,800	3,760	P<0.01	**
9,000	4,000	4,000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
10,00	5,000	5,000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
PBS vs 100 mg/kg (10 d) Ext-Ts		Média				
Dias pós-infecção	PBS	100 mg/kg (10 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
6,000	0,0000	0,5556	0,5556	1,488	P > 0.05	ns
7,000	0,0000	0,1111	0,1111	0,2767	P > 0.05	ns
8,000	2,000	0,6667	-1,333	3,320	P<0.01	**
9,000	4,000	1,571	-2,429	4,994	P<0.001	***
10,00	5,000	1,200	-3,800	3,969	P<0.001	***
PBS vs 100 mg/kg (18 d) Ext-Ts		Média				
Dias pós-infecção	PBS	100 mg/kg (18 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
6,000	0,0000	0,7778	0,7778	2,083	P > 0.05	ns
7,000	0,0000	0,4444	0,4444	1,107	P > 0.05	ns
8,000	2,000	0,3333	-1,667	4,150	P<0.001	***
9,000	4,000	1,556	-2,444	5,306	P<0.001	***
10,00	5,000	0,6250	-4,375	4,719	P<0.001	***
PBS vs 200 mg/kg (10 d) Ext-Ts		Média				
Dias pós-infecção	PBS	200 mg/kg (10 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
6,000	0,0000	0,5556	0,5556	1,488	P > 0.05	ns
7,000	0,0000	0,3750	0,3750	0,9045	P > 0.05	ns
8,000	2,000	0,5000	-1,500	3,618	P<0.01	**
9,000	4,000	1,667	-2,333	4,624	P<0.001	***
10,00	5,000	1,000	-4,000	4,178	P<0.001	***

**Tabela 4.** Análise da variação do peso referente à Figura 1, por meio do Pós-teste de Bonferroni.

PBS vs 50 mg/kg (10 d) Ext-Ts		Média (%)				
Dias pós-infecção	PBS	50 mg/kg	Difference	t	P value	Summary
0,0000	100,0	100,0	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
1,000	99,16	98,74	-0,4172	0,1415	P > 0.05	ns
2,000	99,31	99,18	-0,1353	0,04590	P > 0.05	ns
3,000	100,6	99,60	-0,9639	0,3271	P > 0.05	ns
4,000	103,3	105,0	1,740	0,5903	P > 0.05	ns
5,000	99,65	100,2	0,5866	0,1990	P > 0.05	ns
6,000	94,95	96,64	1,692	0,5742	P > 0.05	ns
7,000	89,96	89,90	-0,06668	0,02262	P > 0.05	ns
8,000	83,84	84,83	0,9910	0,2796	P > 0.05	ns
9,000	79,82	79,58	-0,2356	0,03641	P > 0.05	ns
10,00	72,31	75,43	3,120	0,4175	P > 0.05	ns
PBS vs 100 mg/kg (10 d) Ext-Ts		Média (%)				
Dias pós-infecção	PBS	100 mg/kg (10 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	100,0	100,0	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
1,000	99,16	93,31	-5,844	2,346	P > 0.05	ns
2,000	99,31	91,17	-8,145	3,270	P < 0.05	*
3,000	100,6	93,36	-7,203	2,892	P > 0.05	ns
4,000	103,3	96,21	-7,046	2,829	P > 0.05	ns
5,000	99,65	94,84	-4,804	1,928	P > 0.05	ns
6,000	94,95	93,69	-1,261	0,5063	P > 0.05	ns
7,000	89,96	92,00	2,043	0,8200	P > 0.05	ns
8,000	83,84	89,98	6,136	2,037	P > 0.05	ns
9,000	79,82	92,94	13,12	3,041	P > 0.05	ns
10,00	72,31	90,53	18,22	3,148	P < 0.05	*
PBS vs 100 mg/kg (18 d)		Média (%)				
Dias pós-infecção	PBS	100 mg/kg (18 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	100,0	100,0	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
1,000	99,16	89,80	-9,352	3,755	P < 0.01	**
2,000	99,31	88,77	-10,54	4,232	P < 0.001	***
3,000	100,6	90,30	-10,27	4,123	P < 0.001	***
4,000	103,3	93,19	-10,07	4,041	P < 0.001	***
5,000	99,65	92,71	-6,937	2,785	P > 0.05	ns
6,000	94,95	91,19	-3,762	1,510	P > 0.05	ns
7,000	89,96	90,34	0,3828	0,1537	P > 0.05	ns
8,000	83,84	88,46	4,617	1,566	P > 0.05	ns
9,000	79,82	89,29	9,465	2,291	P > 0.05	ns
10,00	72,31	92,20	19,89	3,548	P < 0.01	**
PBS vs 200 mg/kg (10 d)		Média (%)				
Dias pós-infecção	PBS	200 mg/kg (10 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	100,0	100,0	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
1,000	99,16	91,65	-7,507	3,014	P < 0.05	*
2,000	99,31	91,91	-7,402	2,972	P < 0.05	*
3,000	100,6	89,70	-10,86	4,362	P < 0.001	***
4,000	103,3	93,99	-9,272	3,611	P < 0.01	**
5,000	99,65	92,38	-7,265	2,830	P > 0.05	ns
6,000	94,95	90,18	-4,772	1,859	P > 0.05	ns
7,000	89,96	88,37	-1,594	0,6209	P > 0.05	ns
8,000	83,84	85,93	2,091	0,6535	P > 0.05	ns
9,000	79,82	85,19	5,370	1,245	P > 0.05	ns
10,00	72,31	87,94	15,62	2,699	P > 0.05	ns

**Tabela 5.** Análise de parasitemia referente à Figura 1, por meio do Pós-teste de Bonferroni.

PBS vs 50 mg/kg (10 d) Ext-Ts		Média (%)				
Dias pós-infecção	PBS	50 mg/kg (10 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
6,000	10,65	8,280	-2,370	1,034	P > 0.05	ns
7,000	14,01	10,54	-3,473	1,516	P > 0.05	ns
8,000	17,18	11,30	-5,880	2,181	P > 0.05	ns
9,000	20,50	12,20	-8,300	1,686	P > 0.05	ns
10,00	33,80	9,700	-24,10	4,240	P<0.001	***
PBS vs 100 mg/kg (10 d) Ext-Ts		Média (%)				
Dias pós-infecção	PBS	100 mg/kg (10 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
6,000	10,65	4,467	-6,183	3,166	P < 0.05	*
7,000	14,01	6,456	-7,557	3,870	P<0.001	***
8,000	17,18	6,600	-10,58	4,618	P<0.001	***
9,000	20,50	4,250	-16,25	4,952	P<0.001	***
10,00	33,80	8,460	-25,34	5,756	P<0.001	***
PBS vs 100 mg/kg (18 d) Ext-Ts		Média (%)				
Dias pós-infecção	PBS	100 mg/kg (18 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
6,000	10,65	3,463	-7,188	3,577	P<0.01	**
7,000	14,01	4,525	-9,487	4,722	P<0.001	***
8,000	17,18	4,650	-12,53	5,469	P<0.001	***
9,000	20,50	6,250	-14,25	4,485	P<0.001	***
10,00	33,80	9,225	-24,58	5,765	P<0.001	***
PBS vs 200 mg/kg (10 d) Ext-Ts		Média (%)				
Dias pós-infecção	PBS	200 mg/kg (10 d)	Difference	t	P value	Summary
0,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	P > 0.05	ns
6,000	10,65	4,200	-6,450	3,210	P<0.01	**
7,000	14,01	6,313	-7,700	3,832	P<0.01	**
8,000	17,18	5,950	-11,23	4,615	P<0.001	***
9,000	20,50	6,133	-14,37	4,378	P<0.001	***
10,00	33,80	5,840	-27,96	6,351	P<0.001	***