

**Universidade de Brasília – UnB  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**ANDRÉIA CRISTINA GONÇALVES CASCAES**

**EFEITO DO ÁCIDO ANACÁRDICO *IN VITRO* E EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DA MALÁRIA**

**BRASÍLIA, DF**

**2017**

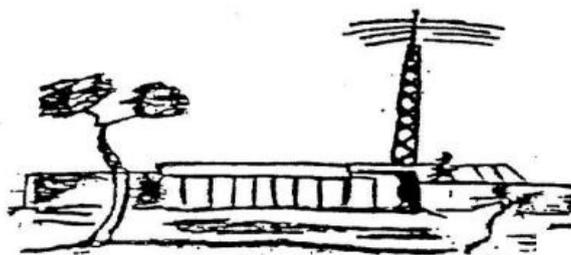
**EFEITO DO ÁCIDO ANACÁRDICO *IN VITRO* E EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DA MALÁRIA**

**ANDRÉIA CRISTINA GONÇALVES CASCAES**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Tropical da Faculdade de  
Medicina da Universidade de  
Brasília, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Karla dos Santos Borges**



**BRASÍLIA, DF  
2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ge Gonçalves Cascaes, Andréia Cristina  
EFEITO DO ÁCIDO ANACÁRDICO IN VITRO E EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DA MALÁRIA / Andréia Cristina Gonçalves  
Cascaes; orientador Maria Imaculada Muniz-Junqueira; co  
orientador Tatiana Karla dos Santos Borges. -- Brasília,  
2017.  
100 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) --  
Universidade de Brasília, 2017.

1. EFEITO DO ÁCIDO ANACÁRDICO IN VITRO E EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DA MALÁRIA. I. Muniz-Junqueira, Maria  
Imaculada, orient. II. dos Santos Borges, Tatiana Karla, co  
orient. III. Título.

## COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Andréia Cristina Gonçalves Cascaes

### **Efeito do ácido anacárdico *in vitro* e em modelos experimentais da malária**

Universidade de Brasília

Medicina Tropical: Biologia das Doenças Infecto Parasitárias

Data da Defesa da Dissertação

14 de julho de 2017

Banca Examinadora

Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira – Universidade de Brasília -  
Presidente

Selma Aparecida Souza Kückelhaus – Universidade de Brasília – Membro  
Interno

Érica Alessandra Rocha Alves – Fundação Oswaldo Cruz – Membro externo

Carlos dos Santos Kückelhaus – Membro Suplente – Secretaria de Estado da  
Saúde do Distrito Federal

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia celular, área de Patologia da Faculdade de Medicina e no Laboratório de malária, área de Medicina Tropical do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília, Brasília-DF com o apoio da bolsa de estudos concedida pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

## *Dedicatória*

*A Deus, pai, que está presente comigo em todos os momentos, dando-me forças para continuar com otimismo e alegria.*

*Aos meus familiares Darcy e Paulo: pelo carinho, dedicação, amor, por estarem comigo em todos os momentos de fracasso e conquista dando-me apoio, forças e motivações para nunca desistir dos meus sonhos. Eduardo e Maristela: pelo carinho e amor, por serem exemplos de humildade e alegria na minha vida, por sempre desejarem o melhor para mim e para o meu futuro.*

*Aos meus irmãos Eduardo Jr: que sempre foi sincero e verdadeiro comigo, por ser motivo de inspiração em minha vida, que me ensinou desde pequena o que é partilhar e ter zelo pelo próximo. Marcelo e Mariana por estarem comigo, por serem motivo de alegria na minha vida e me darem a oportunidade de ser irmã mais velha de pessoas brilhantes. Vocês três são muito especiais e sem vocês eu não saberia o que é amor de irmão.*

*Ao meu noivo Luiz que sempre me conforta com palavras de amor, que me ama do jeito que eu sou, que não me julga, que está comigo nas horas boas e ruins, que segura na minha mão e segue comigo na caminhada da vida.*

*Obrigada a todos vocês.*

## Agradecimentos

A Deus, em primeiro lugar, que é provedor de todas as coisas nesse mundo, que sem Ele nada é possível.

A minha querida orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, pela oportunidade, que me fez ver a pesquisa de uma forma diferente, onde cada resposta é uma conquista, mesmo que venham mais perguntas junto. Pela paciência e dedicação comigo e meu trabalho, espero conseguir um dia ser tão dedicada quanto a senhora.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Karla dos Santos Borges, que foi a primeira a me levar para o mundo das pesquisas, que desde a época da faculdade até os dias atuais acompanha os meus passos. Sempre paciente, divertida e encorajadora, motiva-me a continuar com minhas pesquisas, apesar das dificuldades e adversidades. Quero agradecer por todos os lanches, almoços, jantares, todas as madrugadas que estivemos trabalhando, por todo o sacrifício, dedicação e paciência comigo.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Selma Kuckelhaus, pelos momentos de alegria partilhados e auxílio nas técnicas.

Ao Professor Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro que me forneceu o composto avaliado nessa dissertação e pelo contínuo interesse pela minha pesquisa. Sempre que me encontrava nos corredores, perguntava-me se estava tudo bem e sempre se disponibilizando para ajudar.

Aos meus colegas de caminhada e amigos Danilo Corazza e Lucas Fraga, pelos esforços, pela dedicação e amizade. Sempre me ajudaram, sempre foram companheiros e nunca me deixaram sozinha na hora do aperto e nem na hora do almoço. Que sempre me deram motivos para rir, brincadeiras para gargalhar, funks e músicas de Deus para cantar nas horas mais difíceis.

Aos amigos Luciana Leite, Mayara Oliveira, Isabella Duarte, Marcelo Nóvoa, Ana Luiza Sarkis e André Cunha, que sempre apareciam em horas inusitadas para uma bela visita e tomar um café ou um chá, mas sempre dispostos a ajudar e dar uma palavra amiga.

As alunas de PIBIC – Brenda Tayrine e Vanessa Eschimith, pelo interesse e dedicação a este trabalho e pelo interesse no aprendizado.

As amigas Biomédicas Ana Clara Nogueira, Ananda Polari, Helusa Dias, pela amizade e incentivo de continuar na nossa profissão.

Aos meus colegas Jessica Folha, Tatiane Santos, Gisele Lorrana, Elaine Maciel, Hilda Arruda, Herdson Sousa, Luciana Gottschald, Leandro Barreto, Tamara Oliveira, Tamires Vital, Pedro Gonçalves, Diane Oliveira, Adrielle Veloso, Verenice Paderes e Agatha Moreira, pelo carinho e momentos que passamos juntos.

As técnicas Shirley Couto, Mariangela Souza e Isabella Leão pelo companheirismo e auxílio nas preparações dos meus experimentos.

Ao programa de pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical, pelo qual foi possível a realização do meu mestrado.

Aos organizadores, alunos e tutores do Seminário Laveran & Deane sobre Malária, particularmente ao seu coordenador Prof Dr Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro.

Aos animais que foram estudados nessa dissertação, frágeis e indefesos, suas vidas foram sacrificadas, porém não em vão, e sem eles não seria possível chegar cada vez mais perto de respostas para uma doença, como a malária, que tem o desenvolvimento tão complexo e que ceifa muitas vidas a cada ano.



# SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas</b>	XII
<b>Lista de Figuras</b>	XIII
<b>Resumo</b>	XVII
<b>Abstract</b>	XIX
<b>1. Introdução</b>	1
1.1 Dados epidemiológicos	2
1.2 Avaliação clínica	2
1.3 Ciclo biológico e resposta do hospedeiro	3
1.4 Fisiopatogenia	3
1.5 Citocinas	4
1.6 Óxido Nítrico	7
1.7 Cospúsculo Lipídico	8
1.8 Modelos experimentais animais	8
1.9 Células J774	9
1.10 Tratamento	10
<b>2. Justificativa</b>	11
<b>3. Objetivo</b>	13
<b>4. Materiais e Métodos</b>	15
4.1 Tipo de Estudo	16
4.2 Obtenção do Ácido Anacárdico	16
4.2 Delineamento experimental	17
4.3 Modelo experimental	18
4.4 Modelo <i>In vivo</i>	18
4.5 Modelo <i>In vitro</i>	19
4.6 Estudo <i>in vivo</i>	19
4.7 Animais.	19
4.8 Inóculo	20
4.9 Grupos do estudo	20
4.10 Influência do ácido anacárdico no peso dos animais	22
4.11 Influência do ácido anacárdico no hematócrito dos animais	22
4.12 Influência do ácido anacárdico na parasitemia dos animais	22

4.13 Influência do ácido anacárdico na sobrevida dos animais	23
4.14 Estudo <i>in vivo</i>	23
4.14 Cultivo das células J774.	23
4.15 Avaliação da citotoxicidade do ácido anacárdico pelo teste do MTT utilizando células J774.	24
4.16 Obtenção de eritrócitos normais e parasitados utilizados para estímulo	24
4.17 Influência do ácido anacárdico na produção de corpúsculos lipídicos pelas células J774.	25
4.18 Influência do ácido anacárdico na produção do óxido nítrico pelas células J774.	26
4.19 Influência do ácido anacárdico na produção de citocinas pelos macrófagos J774.	26
4.20 Análises estatísticas	26
<b>5. Resultados</b>	28
5.1 Efeito do ácido anacárdico na sobrevida dos camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) à malária cerebral.	29
5.2 Efeito do ácido anacárdico no hematócrito dos camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) à malária cerebral, infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	31
5.3 Efeito do ácido anacárdico na parasitemia dos camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) à malária cerebral.	33
5.4 Efeito do ácido anacárdico sobre o peso dos camundongos susceptíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) a malária cerebral, infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	34
5.5 Efeito de diferentes concentrações do ácido anacárdico na viabilidade das células J774 em cultura.	38
5.6 Influência do ácido anacárdico sobre a expressão de corpúsculos lipídicos, avaliado pela coloração pelo <i>oil red</i> .	39
5.7 Efeito do ácido anacárdico sobre a produção de oxido nítrico por macrófagos J774.	43
5.8 Influência do ácido anacárdico sobre a produção de fator de necrose tumoral pelas células J774 estimuladas <i>in vitro</i> com eritrócitos	46

parasitados ou não de camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) a malária cerebral.	46
5.9 Influência do ácido anacárdico sobre a produção MCP-1 pelas células J774 estimuladas <i>in vitro</i> com eritrócitos parasitados ou não de camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) a malária cerebral.	47
5.10 Influência do ácido anacárdico sobre a produção de interleucina -10 (IL-10) pelas células J774 estimuladas <i>in vitro</i> com eritrócitos parasitados ou não de camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) a malária cerebral.	49
5.11 Influência do ácido anacárdico sobre a produção de interleucina-6 (IL-6) pelas células J774 estimuladas <i>in vitro</i> com eritrócitos parasitados ou não de camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) a malária cerebral.	51
6. Discussão	54
7. Conclusão	62
8. Referências bibliográficas	66
Parecer Comitê de Ética	80

## Lista de Abreviaturas

<b>AA</b>	<b>Ácido anacárdico</b>
<b>AcOEt</b>	<b>Acetato de Etila</b>
<b>ADN</b>	<b>Ácido dextrorribonucleico</b>
<b>I-CAM-1</b>	<b>Molécula de adesão intercelular-1</b>
<b>CD -31</b>	<b>PECAM</b>
<b>CD-36</b>	<b>Glicoproteína de diferenciação leucocitária, também receptor para trombospondina e eritrócitos infectados com plasmódio.</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetilsulfóxido</b>
<b>EGF</b>	<b>Fator de crescimento epidermal</b>
<b>EN</b>	<b>Eitrócitos normais</b>
<b>EP</b>	<b>Eritrócitos parasitados</b>
<b>FNT</b>	<b>Fator de necrose tumoral</b>
<b>Hex</b>	<b>Hexano</b>
<b>iNOS</b>	<b>Oxido nítrico sintase induzível</b>
<b>IL</b>	<b>IL – Interleucina</b>
<b>LLC</b>	<b>Líquido da castanha de caju</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolissacarideo</b>
<b>LT</b>	<b>LT –linfotoxina</b>
<b>LDT11</b>	<b>Ligante derivado do ácido anacárdico na terminação 11</b>
<b>MCP-1</b>	<b>Proteína quimioatraente de monócitos -1 (CCL2)</b>
<b>MTT</b>	<b>MTT – (3-(4-,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5Diphenyltetrazolium bromide)</b>
<b>NF-κB</b>	<b>Fator nuclear kappa B.</b>
<b>NK –</b>	<b>Células citotóxicas naturais</b>
<b>NO</b>	<b>Óxido nítrico</b>
<b>NOS</b>	<b>Oxido nítrico sintase</b>
<b>AO</b>	<b>Ácido okádico</b>
<b>Pd/C</b>	<b>Paládio-Carvão</b>
<b>Pf</b>	<b>Peso final</b>
<b>Pi</b>	<b>Peso inicial</b>
<b>PMA</b>	<b>Acetato forbol miristato</b>

<b>PPAR</b>	<b>Receptor peroxissomo ativador de proliferação</b>
<b>RF</b>	<b>Fator de Retenção</b>
<b>STF</b>	<b>Solução tampão fostato</b>
<b>TLR</b>	<b>Receptor tipo TOLL</b>

## Lista de figuras

Figura 1: Molécula de ácido anacárdico obtida do líquido da castanha de caju natural.

Figura 2: Reação química de obtenção do derivado (LTD11) a partir do ácido anacárdico extraído do LCC.

Figura 3: Fórmula química da molécula de ácido anacárdico LTD11 obtida do ácido anacárdico extraído do líquido da castanha de caju.

Figura 4: Delineamento experimental nos modelos *in vivo* e *in vitro*.

Figura 5: Tratamento dos animais CBA.

Figura 6: Efeito do tratamento nos animais BALB/c com ácido anacárdico.

Figura 7: Efeito do tratamento nos animais C57BL/6 com ácido anacárdico.

Figura 8: Efeito do tratamento com ácido anacárdico no hematócrito dos animais CBA.

Figura 9: Efeito do tratamento com ácido anacárdico no hematócrito dos animais BALB/c.

Figura 10: Efeito do tratamento com ácido anacárdico no hematócrito dos animais C57BL/6.

Figura 11: Efeito do tratamento com ácido anacárdico na parasitemia dos animais CBA no terceiro e sexto dia.

Figura 12: Efeito do tratamento com ácido anacárdico na parasitemia dos animais BALB/c no terceiro, sexto e oitavo dia.

Figura 13: Efeito do tratamento com ácido anacárdico na parasitemia dos animais C57BL/6.

Figura 14: Peso dos camundongos no dia zero.

Figura 15: Efeito do tratamento com ácido anacárdico na perda de peso dos animais

Figura 16: Perda progressiva de peso dos animais CBA controle e tratados com ácido anacárdico.

Figura 17: Perda progressiva de peso dos animais BALB/c controle e tratados com ácido anacárdico.

Figura 18: Perda progressiva de peso dos animais BALB/c controle e tratados com ácido anacárdico.

Figura 19: Efeito das diferentes concentrações do ácido anacárdico nas células J774, após incubação de 24 horas, na presença de 10  $\mu$ L de solução MTT (5mg/mL).

Figura 20: Influência de ácido anacárdico (AA) sobre a expressão de corpúsculos lipídicos por células J774, avaliados com coloração pelo *oil redO*.

Figura 21: Influência de eritrócitos parasitados (EP) ou não (EN) sobre a expressão de corpúsculos lipídicos por células J774, avaliados pela coloração pelo *oil redO*.

Figura 22: Influência de estímulo com AA, EP e LPS, associados ou não, sobre a expressão de corpúsculos lipídicos por células J774, avaliados pela coloração pelo *oil redO*

Figura 23: Influência do ácido anacárdico sobre a produção de óxido nítrico (NO) pelas células J774 *in vitro*.

Figura 24: Influência do ácido anacárdico sobre a produção de óxido nítrico (NO) pelas células J774 *in vitro* na presença de eritrócitos normais.

Figura 25: Influência do ácido anacárdico sobre a produção de óxido nítrico (NO) pelas células J774 *in vitro* na presença de eritrócitos parasitados.

Figura 26: Análise comparativa dos vários estímulos (AA, EN, EP e LPS) isolados ou associados sobre a produção do NO.

Figura 27: Influência do ácido anacárdico na produção de fator de necrose tumoral pelas células J774.

Figura 28: Influência do ácido anacárdico na produção de FNT- $\alpha$  pelas células J774 estimuladas com eritrócitos parasitados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA.

Figura 29: Influência do ácido anacárdico na produção de MCP-1 pelas células J774 *in vitro*.

Figura 30: Influência do ácido anacárdico na produção de MCP-1 pelas células J774 estimuladas com eritrócitos parasitados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA de animais CBA, BALB/c e C57BL/6

Figura 31: Influência do ácido anacárdico na produção de IL-6 pelas células J774 *in vitro*.

Figura 32: Influência do ácido anacárdico na produção de IL-6 pelas células J774.

Figura 33: Influência do ácido anacárdico na produção de IL-10 pelas células J774 *in vitro*.

Figura 34: Influência do ácido anacárdico na produção de IL-10 pelas células J774 estimuladas com eritrócitos parasitados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA.

## **Resumo**

No ano de 2015 a malária 214 milhões de pessoas e causou 438 mil mortes. No Brasil ocorreram 142.967 casos da doença, no mesmo ano. A doença pode apresentar-se de forma assintomática, sintomática e pode evoluir para as formas graves. O *Plasmodium falciparum* pode causar malária cerebral, a forma mais seria da doença. Os eritrócitos parasitados são capazes de ligar-se a outros eritrócitos e ao endotélio vascular resultando na hiperativação do sistema imunitário. Mesmo com os tratamentos atuais eficientes usados na prática clínica, a doença pode desenvolver-se para as formas graves, facilitada pela resistência do parasito às drogas disponíveis. Espécies vegetais tem sido testados como alternativas terapêuticas. O ácido anacárdico (AA) é extraído da castanha de caju e tem mostrado atividades microbicidas, imunomoduladoras e parasiticida. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do ácido anacárdico *in vivo* em modelos animais da malária e *in vitro*. Nos modelos susceptíveis a malária cerebral (CBA e C57BL/6) e não susceptíveis (BALB/c) infectados pelo *P. berghei* Anka tratados com 150, 100, 50 mg/kg/dia e 25 mg/kg/duas doses. Foram analisados sobrevida, parasitemia, hematócrito e perda progressiva de peso. A citotoxicidade nas células J774 foi avaliada pelo teste de MTT usando utilizadas várias concentrações de ácido anacárdico. O efeito do ácido anacárdico na produção de óxido nítrico foi avaliado através da reação de Griess e a expressão de corpúsculos lipídicos foi realizada pela coloração de *Oil red O*. O efeito de 50µM ácido anacárdico na produção de citocinas foi avaliado depois de estimulação *in vitro* das células J774 com eritrócitos parasitados ou não. A produção de citocinas foi avaliada com o estímulo de LPS e eritrócitos parasitados ou não com 50 µM de ácido anacárdico. Quando os animais CBA foram tratados com 150 e 100mg/Kg/dia de AA foi observado aumento da sobrevida dos animais após infecção com *P.berghei* ANKA. O AA não mostrou toxicidade para as células J774. O AA inibiu a produção do óxido nítrico quando associado com o LPS e eritrócitos parasitados. O aumento da expressão de corpúsculos lipídicos aumentou na presença de eritrócitos parasitados e LPS. O AA não mostrou efeito na produção de FNT- $\alpha$ , porém aumentou a produção de IL-10, e de IL-6 e MCP-1 quando associado ao LPS. Foi observado aumento da produção de MCP-1 das células J774 tratadas com AA e estimuladas com eritrócitos parasitados obtidos de camundongos BALB/c infectados com *P.berghei* ANKA quando comparado com células estimuladas apenas com eritrócitos parasitados. As células J774 mostraram que o tratamento com AA e estímulo com eritrócitos parasitados obtidos de camundongos BALB/c infectados por *P. berghei* ANKA aumenta a produção de MCP-1 em relação às células estimuladas apenas com eritrócitos parasitados. O AA aumentou a produção de IL-10 nas células estimuladas com eritrócitos parasitados de BALB/c, porém diminuiu a produção nas células tratadas com eritrócitos de CBA. Concluímos que os diferentes efeitos do AA na malária experimental provavelmente ocorrem pelos diferentes tipos de desencadeamento das respostas inflamatórias dos modelos experimentais.

## **Abstract**

About 214 million cases of malaria occurred in 2015, leading to 438,000 deaths. In Brazil, 142,967 cases of malaria occurred in this same year. The disease can present as asymptomatic or asymptomatic form and severe disease can develop in some people. *Plasmodium falciparum* can cause cerebral malaria, the most serious form of the disease. Infected red blood cells can bind each other and to endothelial vascular cells, leading in hyperactivation of immune system. Even though the effective current treatments used in clinical practice, disease can evolve to severe forms due to the parasite ability to present drug resistance. Some vegetal species have been tested as alternative treatments. Anacardic acid (AA) is obtained from the cashew nut and has shown some activity against bacteria, parasites and it also has immunomodulatory activity. This work aimed to evaluate the *in vivo* activity in experimental animal models and *in vitro* activity of the anacardic acid as well as its. In cerebral malaria-susceptible CBA and C57BL/6 and resistant BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA and treated with 150, 100, 50 mg/kg/day and 25 mg/kg/day twice by day anacardic acid were assessed the survival rates, parasitemia curves, hematocrit and weight evolution. Cytotoxicity to J774 cells was evaluated using several concentrations of anacardic acid by MTT test. Effect of anacardic acid on nitric oxide production by J774 cells was evaluated by Griess reaction and lipid bodies expression was tested with oil red O. Effect of 50 $\mu$ M anacardic acid on cytokine production was evaluated after *in vitro* stimulation with or without parasitized erythrocyte and LPS. When CBA mice were treated with 100 and 150 mg/kg/day of AA, it was observed an increased survival of the animals after infection with *P. berghei* ANKA. Anacardic acid showed no toxicity to J774 cells. Anacardic acid inhibited NO production when associated with LPS and parasitized erythrocytes. The increase expression of lipid bodies was enhanced in presence of parasitized erythrocytes and LPS. AA have no effect in tumor necrosis factor- $\alpha$  production, it increased IL-10 production and increased the IL-6 and MCP-1 production only when associated to LPS. There was an increased production of MCP-1 by J774 cells treated with AA + parasitized erythrocytes that were obtained from BALB/c *P. berghei*-infected mice when compared with to J774 cells incubated only with parasitized erythrocytes. AA increased IL-10 production when J774 cells were stimulated with parasitized erythrocytes obtained from BALB/c mice; however, it decreased IL-10 production when J774 cells were stimulated with parasitized erythrocytes obtained from CBA mice. We conclude that the differing effects of AA in the different malaria experimental models could occur because these different strains of mice use different pathways of the inflammatory response.

## **Introdução**

## **Dados epidemiológicos**

A malária ocorre em vários países e várias estratégias vêm sendo aplicadas em prol da contenção da malária no mundo. No ano de 2015 foram estimados 214 milhões de casos no mundo e 438 mil mortes. Apesar da redução dos casos, os números persistem inaceitavelmente altos, ainda mantendo a malária como um problema de saúde pública em muitos países (OMS, 2015). As razões para a alta mortalidade incluem muitos fatores, como os socioeconômicos, retardo no diagnóstico da doença, resistência aos antimaláricos, hiperativação do sistema imunitário, entre outros (Sanchs e Malaney, 2002).

O Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de malária nas Américas, sendo que em 2014 ocorreram cerca de 142.967 casos, devidos principalmente ao *Plasmodium vivax*, porém também houve registros da doença por *Plasmodium falciparum*, embora em menor número de casos. Na região Amazônica concentram-se cerca de 98% a 99% dos casos de malária que ocorrem no Brasil (SVS, 2014).

## **Apresentação clínica**

A doença pode apresentar-se sintomática ou não. Em sua forma sintomática, apresenta períodos de febre em dias intercalados, vômitos, mialgia, dor abdominal, diarreia, calafrios, cefaleia, mal-estar, náuseas e tosse seca. Se não tratada de maneira adequada, a doença pode evoluir com complicações, como icterícia, complicações renais, edema pulmonar, e obstrução dos vasos sanguíneos no cérebro, podendo levar o indivíduo à morte (França e cols, 2008). Nas crianças, primo-infectados e gestantes, a malária mais frequentemente evolui para as formas graves, podendo ocorrer anemia grave, acidose metabólica, comprometimento respiratório grave e malária cerebral (Muniz-Junqueira, 2007).

## **Ciclo biológico e resposta do hospedeiro**

Após a inoculação do parasito no organismo humano, ele circula pela corrente sanguínea até o fígado, onde tem tropismo pelos hepatócitos. No fígado, replicam-se e transformam-se em merozoítos. Após esse processo os merozoítos entram na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos, sendo que essa invasão é necessária para continuar o ciclo de vida do parasito. Durante o estágio sanguíneo do parasito, ele replica dentro dos eritrócitos e usa a hemoglobina como fonte de nutrientes e, os eritrócitos além de serem um ambiente propício para a replicação, ainda conseguem esconder os parasitos do sistema imunitário. O eritrócito, após a entrada do parasito, sofre diversas mudanças e uma delas é a perda da deformabilidade da membrana, o que leva à perda da capacidade do eritrócito deformar-se para atravessar o endotélio vascular. Principalmente na infecção pelo *Plasmodium falciparum*, os eritrócitos expressam protusões (*knobs*) e ficam aderidos aos vasos na microcirculação, dificultando o fluxo sanguíneo (Derrost e cols, 2016). Além disso, liberam moléculas capazes de ativar o endotélio microvascular, iniciando uma resposta inflamatória. Como ocorre com a hemozoína que pode estimular a produção exacerbada de citocinas pró inflamatórias (Jamarillo e cols, 2009), além de moléculas que possuem efeito sistêmico. A interação do parasito com o hospedeiro envolve vários mecanismos. O somatório das respostas do hospedeiro ao parasito contribui para a expressão clínica variada da doença, podendo levar as formas graves como síndrome respiratória, anemia severa, acidose metabólica e malária cerebral (Gazzinelli e cols, 2014). Porém, os mecanismos determinantes do desenvolvimento das formas graves ainda não estão completamente esclarecidos.

## **Fisiopatogenia da malária cerebral**

A malária cerebral é uma das formas graves da doença, e nos seres humanos é causada principalmente pela infecção com o *Plasmodium falciparum*.

A sua virulência é determinada por diversos fatores como o tipo de expressão de proteínas na superfície dos eritrócitos infectados, que permite a ligação dessas células na microvasculatura endotelial. A proteína de membrana

eritrocítica do *Plasmodium falciparum*-1 (PfEMP1) é um dos principais antígenos responsável por mediar a adesão celular aos receptores ICAM-1, CD36, E-selectina, N-CAM e CD31 no endotélio (Wassmer e Grau, 2017). Essa ligação resulta em amplo sequestro de eritrócitos infetados, leucócitos e plaquetas, aumento da permeabilidade vascular e hiperativação do endotélio (Utter e cols, 2017) que em consequência leva à desregulação da coagulação, lesões locais, bloqueio da microvasculatura, isquemia, diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Yeo e cols, 2014) e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (FNT) e linfotóxina (Engwerda e cols, 2002). Além disso os linfócitos TCD8<sup>+</sup> atuam no processo de desestruturação da barreira hemato-encefálica, pela secreção de perforinas e granzimas (Nitcheu e cols, 2003). Esses fatores contribuem para a ocorrência da forma cerebral e das outras formas graves da doença (Becker e cols, 2004).

### **Citocinas na malária**

As citocinas inflamatórias possuem um papel importante na resposta imune contra o plasmódio, porém o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias e os efeitos patogênicos que podem resultar na desregulação do sistema imunitário ainda não estão totalmente esclarecidos (Lyke, e cols, 2004).

A interleucina-6 (IL-6) produzida por monócitos, células endoteliais e fibroblastos é um importante marcador inflamatório das atividades imunológicas tanto na resposta adaptativa como inata. (Gomes e cols, 2009). O papel protetor da IL-6 na inibição, juntamente com outras citocinas, do desenvolvimento do estágio hepático do parasito tem sido descrito (Vreden e cols, 1992; Nussler e cols, 1991). Porém, a citocina se encontra aumentada em pacientes que desenvolvem as formas graves da malária (Lyke e cols, 2004). Os níveis séricos de IL-6 em pacientes infectados apresentando formas moderada ou grave da infecção pelo *Plasmodium falciparum*, durante a fase aguda da doença, mantêm-se elevados, e mesmo após o tratamento, os pacientes com malária grave, não apresentam diminuição dos níveis séricos da IL-6 (Wenisch e cols, 1999). Na infecção por *Plasmodium vivax*, a IL-6 encontra-se em níveis elevados nos pacientes que desenvolvem ou não trombocitopenia (Raza e cols, 2014).

No estudo de Grau e cols (2002), em camundongos CBA, foi observado que a IL-6 estava em níveis muito elevados, tanto em camundongos com malária cerebral infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, quanto em camundongos infectados com *Plasmodium yoelii*, que não causa malária cerebral, sugerindo que a interleucina-6 participa ativamente nas várias formas da infecção.

Outra interleucina que participa da resposta do sistema imunitário contra o plasmódio é a interleucina 10 (IL-10), com papel anti-inflamatório, participando da regulação da resposta imune pela inibição da atividade de células auxiliares tipo 1 (T<sub>H</sub>1) citotóxicas naturais (NK) e macrófagos, que são recrutados durante a infecção (Couper e cols, 2008). Já foi mostrado que uma baixa relação IL-10/FNT- $\alpha$  está associado a anemia na malária, sugerindo que essa baixa concentração de IL-10 está associada como aumento da produção de fator de necrose tumoral (FNT) seguido pelo aumento de interferon gama (INF- $\gamma$ ) e que o aumento do FNT está associado com a gravidade da doença (Niikura e cols, 2011).

O FNT- $\alpha$  e a linfotóxina (LT) são citocinas que estão presentes no soro em concentrações elevadas em pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* e apresentam papel crucial no desenvolvimento das formas graves e contribuem para a ativação de algumas vias intracelulares, como a do NF- $\kappa$ B, por meio das moléculas adaptadoras ERK, JNK. Tanto os receptores para o FNT quanto para a LT podem ativar esta via (Zhu e cols, 2005).

Um dos mecanismos para ativação da via do NF- $\kappa$ B é o processamento proteolítico da proteína inibitória I $\kappa$ B que está ligada com o dímero NF- $\kappa$ B. Esse dímero é composto de subunidades tais como Rel-A, Rel-B, c-Rel, p50 e p52 (Baeuerle, Baltimore, 1996; Siebenlist, 1997; Ghosh e cols, 1998). Quando não estimulado o I $\kappa$ B impede a translocação do dímero para o núcleo. Para que ocorra a translocação, é necessário a fosforilação do I $\kappa$ B. Quando liberados, esses dímeros translocam para o núcleo, e são capazes de se ligarem a o ácido desoxiribonucleico (ADN) promovendo regulação gênica (Baldwin 1996; Baeuerle, Baltimore, 1997). Entre os genes que são regulados pelo NF- $\kappa$ B estão aqueles relacionados com a apoptose, adesão celular, proliferação celular, resposta imune inata e adaptativa, resposta oxidativa e remodelamento tecidual.

Entretanto, os fatores que estão envolvidos na ativação da via do NF- $\kappa$ B e modulação das vias dos PPARs na malária ainda não estão esclarecidos.

Borges (2013) avaliou a ativação da via do NF- $\kappa$ B pela expressão das proteínas p52, Rel-A e Rel-B nos macrófagos peritoneais de modelos murinos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) e não susceptíveis (BALB/c) à malária cerebral infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Em relação a proteína Rel-A foi observado um aumento em todos os modelos em comparação com seus grupos controles, e de forma mais intensa no modelo BALB/c, sugerindo que existe ativação da via clássica do NF- $\kappa$ B nos três modelos, porém, a forma de ativação da via ocorre de maneira diferente. A proteína Rel-B mostrou expressão diferente nos três modelos. No modelo BALB/c encontrou-se aumento da sugerindo que não houve translocação da proteína para o núcleo, no modelo CBA houve aumento da proteína Rel-B apenas no núcleo, sugerindo translocação da proteína para o núcleo, porém, sem atividade. No modelo C57BL/6 a expressão de Rel-B foi a menor quando comparado com as outras linhagens, não houve diferenciado Rel-B após infecção pelo plasmódio, sugerindo que o Rel-B não participa do mecanismo de ativação do NF- $\kappa$ B no modelo C57BL/6.

Outras vias intracelulares também têm sido implicadas no desenvolvimento da malária, como a via dos receptores de proliferação peroxissomal ativada (PPARs). Vários estudos mostram que a ativação dessa via culmina na produção de moléculas com atividade anti-inflamatória e imuno moduladora, na regulação do metabolismo lipídico e de carboidratos, além de desempenhar funções no desenvolvimento, diferenciação e apoptose celular (Chinetti e cols, 2001).

Os receptores para o PPAR- $\gamma$  e a via de produção do óxido nítrico parecem estar relacionadas (Mansouri e cols, 2017), pois os PPARs quando se ligam em regiões gênicas podem inibir a produção de iNOS, FNT, IFN- $\gamma$ , e de enzimas formadoras de eicosanoides, que se encontram aumentados na forma cerebral da malária (Karin e cols, 2002; Shehata, 2005; Boop e cols, 2010). Alguns estudos sugerem que o PPAR- $\gamma$  apresenta um papel importante na resistência à malária cerebral e que a sua modulação poderia ser utilizada para evitar a evolução para as formas graves da doença (Li e cols, 2000; Mendes e La Point, 2003; Welch, e cols, 2003; Ye, 2008).

Borges e cols (2017) avaliaram a expressão do PPAR- $\gamma$  nos macrófagos peritoneais em modelos murinos não susceptíveis (BALB/c) e susceptíveis (C57BL/6 e CBA) à malária cerebral. Mostraram que os camundongos C57BL/6 que apresentam a forma cerebral mais grave da doença tinham maior expressão constitutiva do PPAR- $\gamma$ , entretanto, não houve sua translocação do citoplasma para o núcleo dos macrófagos. Nos camundongos CBA também não houve translocação do PPAR- $\gamma$  do citoplasma para o núcleo. Somente nos camundongos BALB/c, que não desenvolvem a forma cerebral da malária, observaram translocação do PPAR- $\gamma$  do citoplasma para o núcleo da célula, sugerindo que a falta da translocação para o núcleo da molécula regulatória PPAR- $\gamma$  poderia contribuir para o desenvolvimento das formas graves cerebrais da malária.

### **Óxido nítrico**

O óxido nítrico é produzido em neurônios, células endoteliais, astrócitos, macrófagos, e células do sistema imunitário por meio da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Em condições fisiológicas normais ele é produzido para mediar a neurotransmissão, regular a diferenciação e sobrevivência dos neurônios, manter a pressão sanguínea controlada, regular o processo inflamatório (Hu e cols, 2016; Percário e cols, 2012). É conhecido como importante mediador de citotóxico de células imunes ativadas, principalmente em situações de estresse oxidativo. (Dusse e cols, 2003).

O papel do óxido nítrico na malária ainda é não está totalmente esclarecido. Stevenson et.al.,1992, sugeriu que o NO possui um papel protetor contra a forma sanguínea do plasmódio por ter efeito tóxico ao parasito.

Percário e cols ,2012 mostraram que a inibição da NO favoreceu o desenvolvimento das formas graves em camundongos Swiss infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA. O óxido nítrico contribui de forma direta para a atividade parasiticida, e indiretamente a produção de citocinas que ativam o sistema imunológico. Entretanto, tem sido sugerido uma associação de alterações oxidativas na infecção pelo *Plasmodium falciparum* e o desenvolvimento da anemia, diminuindo a oxigenação dos tecidos e favorecendo a isquemia (Halliwell; Gutteridge; 2007). Além disso, as mudanças oxidativas

podem promover a mudança da conformação da membrana dos eritrócitos, reduzindo sua deformabilidade, que em consequência dificulta sua circulação, bloqueando o fluxo sanguíneo na microvasculatura (Becker e cols, 2003).

### **Corpúsculo lipídico**

Os corpúsculos lipídicos são organelas ricas em lipídios e se encontram em praticamente todos os organismos, incluindo plantas, fungos, procariotos, mamíferos e não mamíferos (Bozza e cols, 2009). Os corpúsculos lipídicos são sítios ativos para o metabolismo de lipídios araquidônicos. Lipídios neutros são a principal forma de armazenamento do ácido araquidônico, o qual possui papel importante nas células com atividade inflamatória, como molécula de sinalização chave, atuando como segundo mensageiro intracelular, mediador parácrino da ativação celular e como substrato para a conversão enzimática em eicosanóides. Os corpúsculos lipídicos apresentam funções inflamatórias e imunorregulatórias, uma vez que eles contêm enzimas formadoras de eicosanóides, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. (Bozza, 2017). O corpúsculo lipídico está presente nos macrófagos em infecções por patógenos intracelulares como *Trypanosoma cruzi* (D'ávila e cols, 2011), *Toxoplasma gondii* (Charron, 2002), *Leishmania infantum* (Rodriguez e cols, 2017). Na malária a presença dos corpúsculos lipídicos foi evidenciada na cultura de *Plasmodium falciparum* (Jackson, 2004) e em macrófagos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (Borges e cols, 2017).

### **Modelos experimentais animais**

Alguns aspectos da malária grave em seres humanos são eticamente impeditivos para avaliação em pacientes vivos, como por exemplo o acesso aos tecidos cerebrais, que normalmente são processados apenas post-mortem e muitas vezes, por objeção religiosa e ou cultural, os familiares não permitem a análise. Como também, as vezes há despreparo ou falta de material para a coleta do tecido nas áreas endêmicas, além do fato de que esses materiais mostram somente o final do ciclo da doença e não o seu curso completo. Outro problema encontrado na análise da doença em seres humanos é encontrar um

número de pacientes suficientes para a amostragem no local do estudo. Por isso, os modelos animais têm sido usados e têm contribuído significativamente para o melhor entendimento do ciclo do parasito, curso da doença, patogênese e a resposta imunológica no hospedeiro (Zuzarte-Luis e cols 2014). Assim como ocorre variabilidade da doença nos seres humanos, os modelos murinos também possuem peculiaridades no desenvolvimento das formas clínicas da malária (Zuzarte-Luis e cols, 2014). Os animais da linhagem C57BL/6 desenvolvem malária cerebral (White e cols, 2009), síndrome aguda pulmonar, angustia respiratória (Van Don Steen e cols, 2010), comprometimento renal (Sinniah 1999), hepático (Yoshimoto e cols. 1998) e placentário (Rodrigues-Duarte e cols, 2012). Os camundongos da linhagem CBA, também desenvolvem malária cerebral e complicações pulmonares A infecção por *Plasmodium berghei* ANKA para os dois modelos são fatais e eles morrem geralmente no 6º dia de infecção (Carvalho e cols, 2000). Já os camundongos BALB/c são resistentes a malária cerebral, mas desenvolvem outras formas graves como comprometimento renal (Elias, 2012); lesão pulmonar (Yoshimoto e cols, 1998) e anemia grave (Evans, 2006) mais tardiamente.

### **Células de Linhagem J774**

A cultura celular consiste em manutenção e replicação in vitro de células vivas, possibilitando análise do metabolismo envolvido na regulação celular, síntese de proteínas, avaliação de componentes celulares, interação com agentes externos. Existem diversos sistemas de cultura celular tanto animais quanto humanos (Luisi e cols, 2004). As células geralmente usadas são células imortalizadas que são capazes de proliferar em cultura e se manter indefinidamente após a desativação de seus mecanismos de morte celular ([BCRJ acessado em 03-junho-2017](#)).

As células J774 são uma linhagem de macrófago imortalizadas, oriundas de camundongos BALB/c. Nessas células, a via do NF- $\kappa$ B é desencadeada por ligantes dos receptores para TLR 1,2,3,4,9; ligante NOD, e também podem desencadear a via IRF através dos ligantes como “transfected poly” agonistas STING 2`3’ (Jin e cols, 2011). As células dessa linhagem J774 têm sido utilizadas para ensaios de fagocitose (Leimaire e cols, 2014), ensaios envolvendo

produção de óxido nítrico (Vital e cols, 2008) e produção de interleucina-1 (Hogquist e cols, 1991).

## **Tratamento**

O tratamento da malária com drogas antiplasmodiais é feito de acordo com o tipo de plasmódio com o qual o indivíduo está infectado. Os fármacos mais comumente usados são a artemisinina, mefloquina, cloroquina, doxiciclina entre outros, que destroem o parasito em algum estágio específico de desenvolvimento (Germano, 2005). Entretanto, o extenso e crescente problema de resistência às drogas antimaláricas coloca dificuldades ao tratamento, como a necessidade de adotar um grande espectro de arsenal terapêutico para permitir a associação de drogas, acrescido da necessidade de também lidar com os diferentes estágios do ciclo de vida do parasita. A resistência do parasito aos medicamentos atualmente disponíveis é de considerável importância para o desenvolvimento da doença (Aguiar e cols, 2012), sendo, portanto, urgentemente necessários estudos sobre novos fármacos e sobre novas estratégias de tratamento, como a utilização de drogas com efeito imunomodulador.

Espécies vegetais com atividade biológica vêm sendo utilizadas desde o primórdio dos tempos, e considerando o desenvolvimento de resistência por muitos micro-organismos, cada vez mais são avaliadas como alternativas terapêuticas (Archana e cols, 2011).

Dentre outros compostos, o ácido anacárdico pertence à família das Anacardiaceae, e proveniente da castanha de caju (Trevisan e cols, 2006) com atividade agonista do PPAR- $\gamma$  (Lima, 2016).

O estudo de Sung e cols 2008, evidenciou que ácido anacárdico apresenta atividade relacionada com a via do NF- $\kappa$ B através da inibição da ativação da via em diversas espécies celulares, como células de pulmão, próstata, rim e escamosas, por diversos desencadeadores, como fator de necrose tumoral (TNF), lipopolisacarídeo (LPS), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), fator de crescimento epidermal (EGF) e ácido okadico (OA). Nesse estudo também foi mostrado que o ácido anacárdico é capaz de potencializar a ativação da via das caspases, suprimir a expressão de

genes anti apoptóticos, genes envolvidos na proliferação celular. Também já foi evidenciado que o ácido anacárdico tem atividade de agonista parcial do PPAR- $\gamma$  (Lima e cols, 2016). Outras atividades também já foram mostradas como inibição de lipoxigenase e cicloxigenase, que são compostos que participam da produção de eicosanoides, provavelmente por estimular a atividade e a expressão dos PPARs, principalmente o PPAR- $\gamma$  (Kubo e cols, 2008; Wisastra e cols 2013), atividade parasiticida (Cui, 2008), antimicrobiana (Castillo-Juarez, 2007), gastroprotetora, (Moraes e cols, 2010), anti-inflamatória (Sungecols, 2008), antioxidante, (Masuoka e Kubo, 2004), entre outras.

Por meio da atividade antioxidante, o ácido anarcádico é capaz de proteger as células humanas do estresse oxidativo (Trevisan e cols, 2006; Morais e cols, 2010) pela inibição de enzimas pré-oxidativas, da conversão de espécies reativas mediante presença de íons metálicos e quelantes (Lodovici e cols, 2001; Kubo e cols, 2006).

Cui e cols (2008) realizaram ensaios com *Plasmodium falciparum* *in vitro* e mostraram que o ácido anacárdico inibiu o crescimento parasitário. Contudo, pouco se sabe sobre o mecanismo de interação do ácido anacárdico e os PPAR- $\alpha$ , - $\beta$  e - $\gamma$  e sua influência sobre a evolução da malária grave.

## **Justificativa**

O ácido anacárdico é uma molécula agonista parcial do PPAR- $\gamma$  que tem mostrado potencial microbicida, parasiticida, antioxidante, antitumoral, entre outros. A molécula que por sua vez também interage indiretamente com a via do NF- $\kappa$ B, a qual está envolvida intimamente na resposta inflamatória contra o plasmódio. A via do PPAR- $\gamma$  é de extrema importância na doença por ter atividade regulatória sobre a via do NF- $\kappa$ B, que é responsável por produzir citocinas inflamatórias e encontra-se superativada nas formas graves da doença. Além disso, o aumento da resistência do parasito aos tratamentos atualmente disponíveis é preocupante, além da ainda elevada taxa de morbimortalidade que a malária apresenta nos dias atuais. A utilização de um imunomodulador com potencial ação parasiticida poderia ser de grande contribuição para o tratamento da doença e para a diminuição das sequelas causadas pela hiperativação do

sistema imunitário que ocorre nas formas graves da infecção. Por isso, o ácido anacárdico se torna um potencial candidato para estudo devido a possibilidade de evitar as formas graves da doença, pelo papel plasmodicida e potencial imunomodulador.

## **Objetivos**

Avaliar a influência do ácido anacárdico sobre a evolução da infecção pelo *Plasmodium berghei* Anka, em modelos experimentais susceptíveis (CBA e C57BL6) ou resistentes (BALB/c) à malária cerebral e o possível efeito modulatório sobre a atividade das células J774.

E foram desenvolvidos especificamente por:

- Avaliar a influência do tratamento com ácido anacárdico de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA sobre o peso, sobrevida, hematócrito e parasitemia.
- Avaliar a citotoxicidade do ácido anacárdico em diferentes concentrações pela determinação da viabilidade das células pelo metabolismo mitocondrial dos macrófagos J774 pelo teste do MTT.
- Avaliar o efeito do ácido anacárdico sobre a produção de radicais livres (óxido nítrico) em cultura de células de linhagem de macrófagos de camundongo.
- Avaliar o efeito do ácido anacárdico sobre a produção de corpúsculos lipídicos em cultura de células de linhagem de macrófagos de camundongo.
- Avaliar o impacto do ácido anacárdico sobre a produção da citocina MCP-1, de citocinas reguladas direta ou indiretamente pela via do NF- $\kappa$ B (TNF, IL-6) e influenciadas pela atividade dos PPARs (IL-10) no sobrenadante da cultura de macrófagos J774 estimulados com eritrócitos de camundongos susceptíveis ou não a malária cerebral.

## **Materiais e Métodos**

## **Tipo de Estudo**

O presente estudo foi do tipo experimental e foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e no Laboratório de Malária do Núcleo de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Foram estudados macrófagos imortalizados de camundongo da linhagem J774 e camundongos da linhagem BALB/c, animais não susceptíveis a malária cerebral, e animais das linhagens C57BL/6 e CBA, que são susceptíveis à malária cerebral. Os camundongos foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

Durante todo o trabalho as normas éticas de pesquisa científica com animais foram rigorosamente obedecidas e o presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade de Brasília, processo número 66695/2016.

Para realização desse trabalho, as diretrizes “ARRIVE” do *National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research* (NC3R<sup>s</sup>) foram estritamente obedecidas (Kilkenny e cols, 2010).

## **Obtenção do ácido anacárdico**

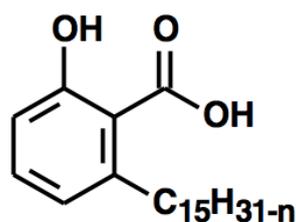
Em um balão de vidro de 100 ml foram adicionados 30,0 g de líquido da castanha de caju (LCC) natural (~ 86,078 mmols), 15,0 g de Hidróxido de cálcio {Ca (OH)<sub>2</sub>} (~202,449 mmols) em mistura de 180,0 ml de metanol (MeOH) e água destilada (30,0 ml). O Ca (OH)<sub>2</sub> foi dissolvido em água antes de ser adicionado ao sistema reacional, que permaneceu em agitação e submetido a refluxo por 3 horas, equipado com sistema de resfriamento do condensador à 0°C e aquecimento em banho de óleo à 80°C. Após este período em refluxo, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada.

O sólido proveniente da filtração foi lavado com acetato de etila a fim de serem retirados os demais componentes indesejáveis do LCC. Os sais de cálcio formados foram tratados com solução de ácido clorídrico a 50%, em agitação, submetido a banho de gelo até atingir pH 1, que pôde ser verificado através da conferência por papel indicador de pH. O meio ácido favorece a liberação da mistura de ácidos anacárdicos, que posteriormente foram extraídos com acetato

de etila.

A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio e seca em sulfato de sódio anidro para evitar resquícios de água, que porventura poderiam ter ficado após este processo de elaboração. O solvente foi evaporado à pressão reduzida, a mistura de ácidos anacárdicos foi purificada em coluna cromatográfica de gel de sílica, eluída em mistura de hexano e acetato de etila a 20%, fornecendo a mistura pura. O rendimento obtido foi de 80%, fornecendo a mistura de ácido anacárdico insaturado.

A mistura de ácidos anacárdicos insaturada foi purificada em coluna de gel de sílica, eluída em hexano e acetato de etila, cujas concentrações variaram de hexano 95%: acetato de etila 5% a hexano 50% acetato de etila 50%, fornecendo a mistura pura, com rendimento de 90% (Heys 2017). A figura 1 mostra a molécula de ácido anacárdico extraída do LLC. (Figura 1).



**n= 0,2,4 ou 6**

Figura 1: Molécula de ácido anacárdico obtida do líquido da castanha de caju natural.

Em um frasco de hidrogenação foram adicionados 5,00 g da mistura de ácidos anacárdicos, previamente purificada (~14,346 mmols), 0,20 g de catalisador paládio-carvão a 10% (Pd/C) e etanol (50,0 mL). A adição do catalisador foi realizada em banho de gelo.

O sistema de hidrogenação foi submetido à pressão de 60Psi em reator Paar, à temperatura ambiente por 6 horas. Em seguida a mistura foi filtrada em um funil sinterizado próprio e o solvente retirado por pressão reduzida. O resíduo obtido foi recristalizado em hexano, fornecendo o ácido anacárdico saturado, que apresentava uma aparência de um sólido branco (Heys 2017). A figura 2 mostra a reação química ocorrida para obtenção da variável LTD11 a partir do ácido anacárdico extraído do LLC.

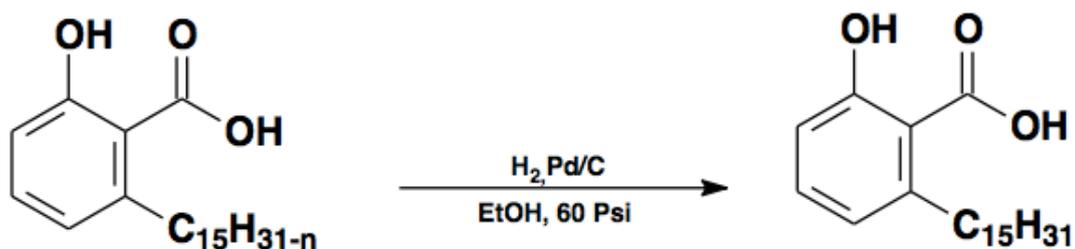
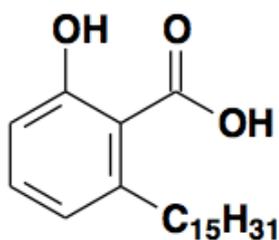


Figura 2: Reação química de obtenção do derivado (LTD11) a partir do ácido anacárdico extraído do LCC.

Ao final foi obtido um composto com 90% de rendimento, sólido, branco, com ponto de fusão entre 81°C e 84°C, fator de retenção (RF) de 0,48, (Hexano 80% e Acetato de etila 20%), massa molar de 348,52 g/mol e fórmula molecular  $C_{22}H_{36}O_3$  (Heys 2017) (Figura 3).



LDT 11

Rendimento: 90%  
 RF: 0,48 (Hex 80%: AcOEt 20%)  
 Ponto de fusão: 81oC- 84oC  
 Fórmula Molecular:  $C_{22}H_{36}O_3$   
 Massa molar: 348,52 g/mol  
 1 $\mu$ M possui 348 $\mu$ g/ml

Figura 3: Fórmula química da molécula de ácido anacárdico LTD11 obtida através do ácido anacárdico extraído do líquido da castanha de caju.

### Delineamento experimental

Na figura 4 encontra-se o esquema do delineamento experimental estudado *in vitro* e *in vivo*.

Nosso trabalho foi desenvolvido em duas partes, uma *in vivo* utilizando camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA e C57BL/6) e camundongos não susceptíveis à forma cerebral da doença (BALB/c) e outra *in vitro*, utilizando células J774.

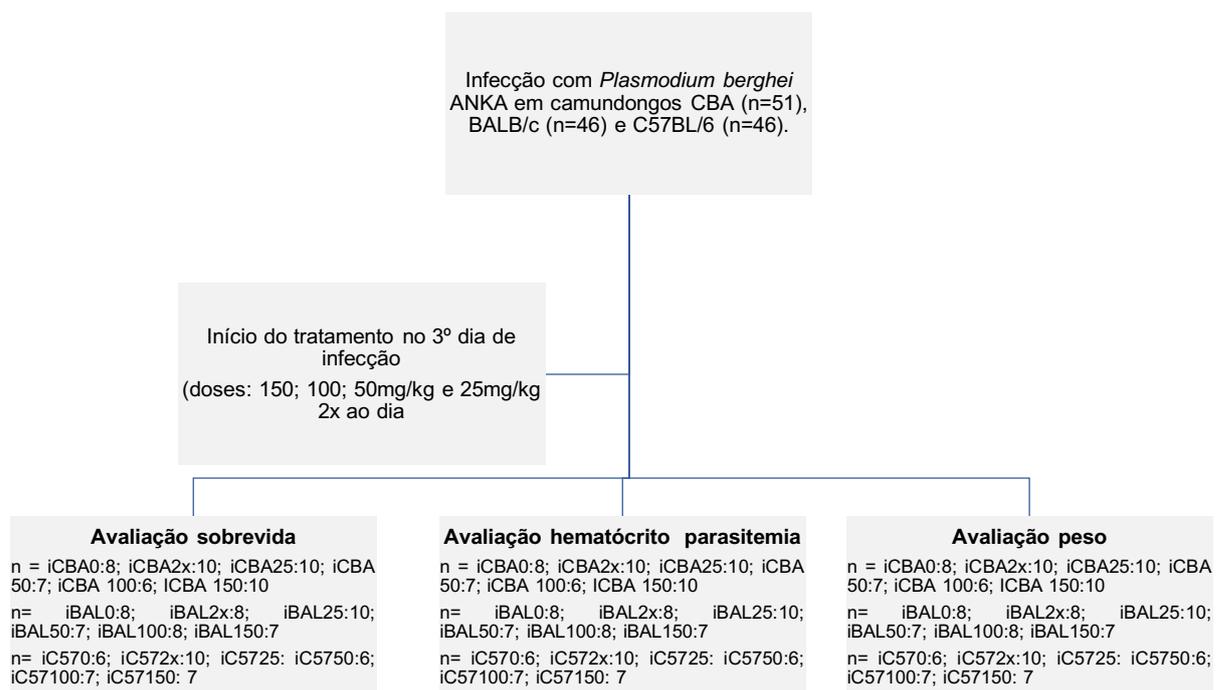
Para a avaliação dos aspectos clínicos foram usadas três linhagens de camundongos, BALB/c que são animais naturalmente resistentes a malária cerebral, C57/BL6 que são susceptíveis a malária cerebral e também à maior

parte das manifestações graves da doença e a linhagem CBA que também é susceptível a malária cerebral, porém a manifestação ocorre por ativação de vias diferentes. Para análise dos parâmetros clínicos, os animais foram separados em seis grupos: grupo controle, grupo tratado com 150 mg/kg/dia; 100 mg/kg/dia e 50 mg/kg/1 vez por dia de ácido anacárdico, 25 mg/kg/2 vezes por dia de ácido anacárdico, sendo que outro grupo como controle não tratado para comparação com o grupo tratado com 25 mg/kg duas vezes ao dia também foi estudado.

Para analisarmos a produção de óxido nítrico e a formação de corpúsculos lipídicos pelas células J774, foi utilizado sangue de camundongos SWISS infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

## Modelo experimental

### Modelo *In vivo*



## Modelo *in vitro*

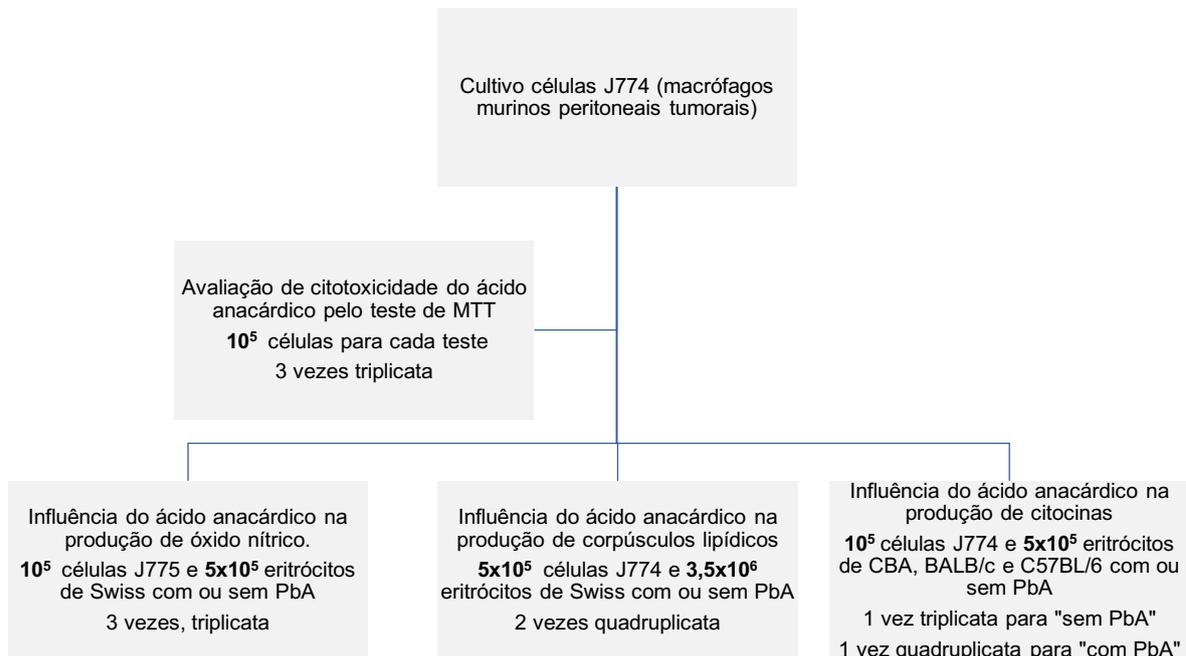


Figura 4: Delineamento experimental nos modelos *in vivo* e *in vitro*.

## Estudo *in vivo*

### Animais

Os camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c e Swiss foram obtidos do alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e mantidos com água e ração para camundongos ad libitum, em ciclo de claro/escuro de 12 horas, em estantes ventiladas. Para avaliação da influência do ácido anacárdico sobre a sobrevivência, parasitemia, hematócrito e peso foram usados animais machos entre 8 a 10 semanas de vida das linhagens CBA (n = 51), BALB/c (n = 46) e C57BL/6 (n = 46). Para avaliação influência do ácido anacárdico sobre a produção de radicais livres e corpúsculo lipídico foram usados camundongos SWISS (n = 6), sendo 3 machos e 3 fêmeas, entre 8 e 18 semanas. Para avaliar a influência do ácido anacárdico sobre a produção de citocinas pelas células J774 foram utilizados, como estímulo, eritrócitos parasitados ou não, obtidos de animais BALB/c, C57BL/6 e CBA.

## Inóculo

Foi utilizada a cepa do *Plasmodium berghei* ANKA mantida no Laboratório de Malária do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília. Para o uso, a cepa era previamente descongelada e eram feitas pelo menos duas passagens em animal para recuperação da virulência da cepa. Os camundongos foram inoculados com  $10^6$  eritrócitos parasitados em solução salina tamponada com fosfato pH 7.2, estéril, num volume final de 100  $\mu$ l, por via intraperitoneal. Para o inóculo dos animais, o sangue era retirado apenas quando a parasitemia estava acima de 10% nos animais de passagem, através da punção cardíaca. A quantidade total de eritrócitos era quantificada em hematocítômetro e em seguida diluída em solução salina tamponada com fosfato pH 7,2, estéril, para obtermos  $10^6$  eritrócitos infectados em 100  $\mu$ l.

## Grupos do estudo

Para avaliar o efeito do ácido anacárdico na sobrevida, parasitemia e peso dos animais, foram estudados 4 grupos para cada linhagem de camundongo (C57BL/6, CBA, BALB/c):

**Grupo controle** (n = CBA: 8; BALB/c: 8; C57BL/6: 6): Animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados apenas com veículo de diluição da droga, que consistia em 20  $\mu$ l de solução fisiológica 0,9% com 2% de Tween 80 por via oral, a partir do 3º dia de infecção até o dia da morte espontânea.

**Grupo tratado 150** (n = CBA: 10; BALB/c: 7; C57BL/6: 7): Animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com 150 mg/kg/dia (438 $\mu$ M) de ácido anacárdico diluído em 20  $\mu$ l de solução fisiológica 0,9% com 2% de Tween 80, por via oral, a partir do 3º dia até o dia da morte espontânea.

**Grupo tratado 100** (n = CBA: 6; BALB/c: 8; C57BL/6: 7): Animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados com 100 mg/kg/dia (219 µM) de ácido anacárdico diluído em 20µl de solução fisiológica 0,9% com 2% de Tween 80, por via oral, a partir do 3º dia até o dia da morte espontânea.

**Grupo tratado 50** (n= CBA: 7; BALB/c: 7; C57BL/6: 6): Animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados com 50 mg/kg/dia (109,5 µM) de ácido anacárdico diluído em 20 µl de solução fisiológica 0,9% com 2% de Tween 80, por via oral, a partir do 3º dia até o dia da morte espontânea.

**Grupo controle/ duas vezes** (n = CBA: 10; BALB/c: 8; C57BL/6: 10): Animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados apenas com veículo de diluição da droga duas vezes por dia, que consistia em 20 µl de solução fisiológica 0,9% com 2% de Tween 80 por via oral a partir do 3º dia de infecção até o dia da morte espontânea.

**Grupo tratado 25/duas vezes** (n = CBA: 10; BALB/c: 8; C57BL/6: 10): Animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados com 25 mg/kg (54,74 µM) de ácido anacárdico, duas vezes por dia, diluído em 20 µl de solução fisiológica 0,9% com 2% de Tween 80, por via oral, a partir do 3º dia até o dia da morte espontânea.

O tratamento foi feito por ingestão por via oral, no qual era inserido delicadamente na boca dos camundongos uma ponteira colocada em uma pipeta de 20 µL contendo o medicamento, que era sugado espontaneamente pelos animais, evitando possíveis traumas pelo tratamento.

### **Influência do ácido anacárdico no peso dos animais**

Os animais foram pesados diariamente a partir do dia do inoculo com *Plasmodium berghei* ANKA até o dia da morte espontânea. A partir do 3º dia os animais eram tratados conforme o grupo e eram sempre pesados no mesmo

horário, na mesma balança (OHAUS CT200-S capacidade 200 g) e o peso expresso em gramas.

### **Influência do ácido anacárdico no hematócrito dos animais**

Para avaliar a influência do ácido anacárdico na anemia dos animais, foi realizado o hematócrito no 3º, 6º e 8º dia de infecção. Foi retirado cerca de 10 µl de sangue da ponta da calda dos animais e colocados em capilar de vidro com EDTA. O capilar foi vedado com fogo e colocado para centrifugar em 330 G por 10 minutos.

### **Influência do ácido anacárdico na parasitemia dos animais**

Para avaliar se o ácido anacárdico teve influência na parasitemia, foram realizadas lâminas histológicas de sangue através da técnica de distendido utilizando sangue da ponta da cauda dos animais no 3º, 6º e 8º dia. As lâminas foram coradas com kit rápido de coloração panótica, e analisadas em microscópio óptico com aumento de 1000x, sendo contadas 500 eritrócitos por preparação. A parasitemia foi representada pela porcentagem de eritrócitos parasitados.

### **Influência do ácido anacárdico na sobrevivência dos animais**

Para avaliar o efeito do ácido anacárdico na sobrevivência dos animais, a morte espontânea dos animais foi anotada diariamente até o dia da morte do último animal em acompanhamento e analisada pela curva de sobrevivência segundo o método de Kaplan-Meier, sendo que a diferença estatística foi analisada pelo método de Logrank, para a análise comparativa entre o grupo controle e o grupo tratado, para cada dose do ácido anacárdico e para todas as linhagens de camundongos avaliadas.

## **Estudo *in vitro***

### **Cultivo das células J774**

A linhagem de células J774A.1 (ATCC® TIB-67™) utilizada nesse trabalho foram cedidas pela Profª Drª Tatiana Karla dos Santos Borges. A cepa foi descongelada em banho Maria a 37°C e descongelada em 10 ml de meio de descongelamento. O tubo foi centrifugado por 10 min a 200 G e depois foi retirado o sobrenadante e colocado em placa aderente para cultivo celular KASVI (K11-2050 com filtro) acrescentado 10 ml de meio de descongelamento e incubado em câmara úmida com 5% CO<sub>2</sub> por 24 h. Então foi retirado 5ml do meio de descongelamento, acrescentado 5 ml de meio de manutenção e incubado novamente nas mesmas condições. Após 24 h foram retirados 10 ml do meio atual e acrescentado 10 ml de meio de manutenção e incubado novamente. Após o tempo de incubação as células foram trocadas para placa não aderente e colocadas para crescer sob mesmas condições.

### **Avaliação da citotoxicidade do ácido anacárdico pelo teste do MTT utilizando células J774.**

Para avaliar se o ácido anacárdico tinha efeito citotóxico nos macrófagos J774 foi realizado o teste do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que avalia a viabilidade celular. Foram incubadas 10<sup>5</sup> células J774 com ácido anacárdico pré diluído com 1% de DMSO (Sigma-Aldrich) em diluição seriada a partir de 100 µM até 0,78 µM em meio de cultura por 24 h em placa de 96 escavações, de fundo chato, estéreis (TPP, Switzerland, Europe). Após as 24 h foi acrescentado 10 µl de 2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) na concentração de 5mg/ml e incubado por mais 4 h. Em seguida, foi colocado 50 µl de DMSO para interromper a reação e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Spectramax plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) em 570 nm.

## **Eritrócitos normais e parasitados utilizados como estímulo**

Foram obtidos eritrócitos de camundongos infectados ou não infectados das quatro linhagens estudadas (BALB/c, C57BL/6, CBA e SWISS). Para fazer as determinações, de óxido nítrico e corpúsculo lipídico foram utilizados eritrócitos parasitados de camundongos SWISS (n = 6) com 8 a 18 semanas e para as dosagens de citocinas foram utilizados eritrócitos parasitados de camundongos CBA (n = 2) BALB/c (n = 2), C57BL/6 (n = 2) e de 8 a 10 semanas. Três animais Swiss e 1 das outras linhagens foram inoculado com  $10^6$  eritrócitos parasitados suspensos em salina tamponada com fosfato, pH 7.2, estéril, num volume final 100  $\mu$ l. 3 animais Swiss e 1 das outras linhagens foram inoculados com apenas salina tamponada com fosfato, pH 7.2, estéril. Após 4 dias os animais sofreram eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, e o sangue foi obtido por punção cardíaca. Um distendido do sangue foi feito em uma lâmina para determinar a parasitemia no momento do estudo. O sangue foi centrifugado a 200 G por 10 min, e lavado 3x com STF antes do uso.

## **Influência do ácido anacárdico na expressão de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos J774.**

Para avaliar o efeito do ácido anacárdico na produção de corpúsculos lipídicos,  $5 \times 10^5$  células J774 foram incubadas por 2 h em placa de cultivo com 24 escavações e lamínula de vidro de 13 mm no fundo, para permitir a aderência à lâmina, em seguida foram adicionados,  $5 \times 10^5$  eritrócitos de camundongos Swiss com parasitemia de 10% ou não parasitados, lipopolissacarideo 50 ng/ml de ácido anacárdico. O experimento foi realizado duas vezes em quadruplicata

A dose de 50ng/ml foi escolhida por apresentar atividade plasmodicida de acordo com Cui e cols (2008). As células foram então incubadas por mais 24 h, em estufa de CO<sub>2</sub> 5%. Após a incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30min, lavadas 2 vezes com STF, pH 7,2 e uma vez com álcool isopropílico a 60%. Em seguida, as células foram coradas com solução de óleo vermelho O (Sigma-Aldrich) por 15min. O excesso do corante foi retirado e as escavações foram lavadas uma vez com 1 ml de álcool isopropílico a 60% e depois duas vezes com 1 ml de água destilada. Os núcleos

celulares foram corados com hematoxilina de Mayer por 15 min, lavadas novamente com água destilada e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com uma fina camada de meio de montagem, contendo 10 g de gelatina, 60 ml de água destilada, 70 ml de glicerol e 0,25 g de fenol. Em 200 células foram determinados o número de corpúsculos lipídicos que cada célula estava expressando, e a porcentagem de células que expressavam corpúsculos lipídicos, sendo então determinada a média de corpúsculos lipídicos por célula. O índice corpuscular foi calculado pela multiplicação da proporção de células expressando corpúsculo lipídicos pela média de corpúsculos lipídicos expressos por célula.

#### **Influência do ácido anacárdico na produção do óxido nítrico pelas células J774.**

Para avaliar o efeito do ácido anacárdico na produção de óxido nítrico, foram colocadas  $10^5$  células J774 em placa de 96 escavações, de fundo chato, estéreis (TPP), e incubadas por duas horas em câmara úmida, em estufa de  $\text{CO}_2$  para permitir a aderência das células, e em seguida foram acrescentados  $5 \times 10^5$  eritrócitos parasitados ou não e  $50 \mu\text{M}$  ácido anacárdico ou meio de cultura e incubados por 24 h. O experimento foi realizado três vezes em triplicata. Como controle positivo foi utilizado LPS 50 ng/ml. A produção de óxido nítrico foi quantificada no sobrenadante das células pela reação de Griess (100  $\mu\text{l}$  do reagente de Griess – [0,1% sulfanilamida a 1% e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 25%] com 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante da amostra). A leitura foi feita em espectrofotômetro em 540 nm. A curva padrão de óxido nítrico foi feita pela diluição seriada de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ). Iniciou com 200  $\mu\text{M}$  e foram feitas as diluições de 1:2 até 1:128 com água destilada. Para o valor zero, foi utilizado apenas água destilada (0  $\mu\text{M}$ ). As leituras da curva padrão e dos testes foram feitas ao mesmo tempo

#### **Influência do ácido anacárdico na produção de citocinas pelos macrófagos J774.**

Para avaliar o efeito do ácido anacárdico na produção de citocinas foram utilizadas  $10^5$  células J744 por escavação, que foram incubadas por 2 h em placa

de 24 escavações, estéreis, para permitir a aderência à lâmina, em seguida foram estimulados com  $5 \times 10^5$  eritrócitos de camundongos BALB/c, ou C57BL/6 ou CBA infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, com parasitemia média de 10% e 50  $\mu$ M de ácido anacárdico e incubados por mais 8 h, em estufa de CO<sub>2</sub>. Foram retirados 50  $\mu$ l do sobrenadante das culturas e as concentrações do FNT- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e MCP-1, por citometria de fluxo, conforme instruções do fabricante, foram determinadas. As citocinas foram dosadas com kit comercial “Cytometry Bead Array – Mouse Inflammation Kit” - BD™. Os experimentos para os testes que foram realizados com eritrócitos não parasitados foram feitos uma vez em duplicata, sendo que a leitura foi feita em triplicata para cada ponto após homogeneização das amostras. Os experimentos para os testes que foram realizados com eritrócitos parasitados foram feitos uma vez em duplicata, sendo que a leitura foi feita em quadruplicata para cada ponto após homogeneização das amostras. As amostras foram lidas no citometro de fluxo BD LRS FORTESSA, e analisadas pelo software FCAP Array v3.0 para Windows.

### **Análises estatísticas.**

Os dados obtidos foram previamente analisados quanto a normalidade da distribuição das amostras pelo teste de Kolmogorov e para a variância da distribuição das amostras pelo teste de Bartlett. Para análises de duas amostras não relacionadas não paramétricas foi utilizado teste Mann-Whitney e para duas amostras não relacionadas paramétricas foi utilizado teste t-Student. Para análise de mais do que duas variáveis não relacionadas não paramétricas foi utilizado teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação múltipla e para amostras não relacionadas paramétrica foi utilizado teste ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação múltipla. Quando o “n” da amostra era muito pequeno foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis, independente da normalidade. A curva de mortalidade foi analisada pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística pelo teste de Logrank. As análises foram realizadas no software Graphpad Prism 6 para MacOS X (Graphpad software – San Diego – USA).

## **Resultados**

## Efeito do ácido anacárdico na sobrevivência dos camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) à malária cerebral.

O efeito do tratamento com ácido anacárdico na sobrevivência dos camundongos susceptíveis ou não à malária cerebral foi avaliada pela verificação da morte espontânea dos animais tratados em comparação aos animais não tratados utilizando as doses de 50, 100 e 150mg/kg/dia.

O tratamento com o ácido anacárdico aumentou a sobrevivência apenas dos camundongos susceptíveis CBA tratados com as doses de 150 e 100 mg/kg/dia. No tratamento dos animais com ácido anacárdico foi observado que no sexto dia de infecção 85,71% dos animais controles já havia morrido enquanto 100% dos animais tratados com 150 mg/kg/dia ainda estavam vivos e 71,43% dos animais tratados com 100 mg/kg/dia estavam vivos (Figura 5).

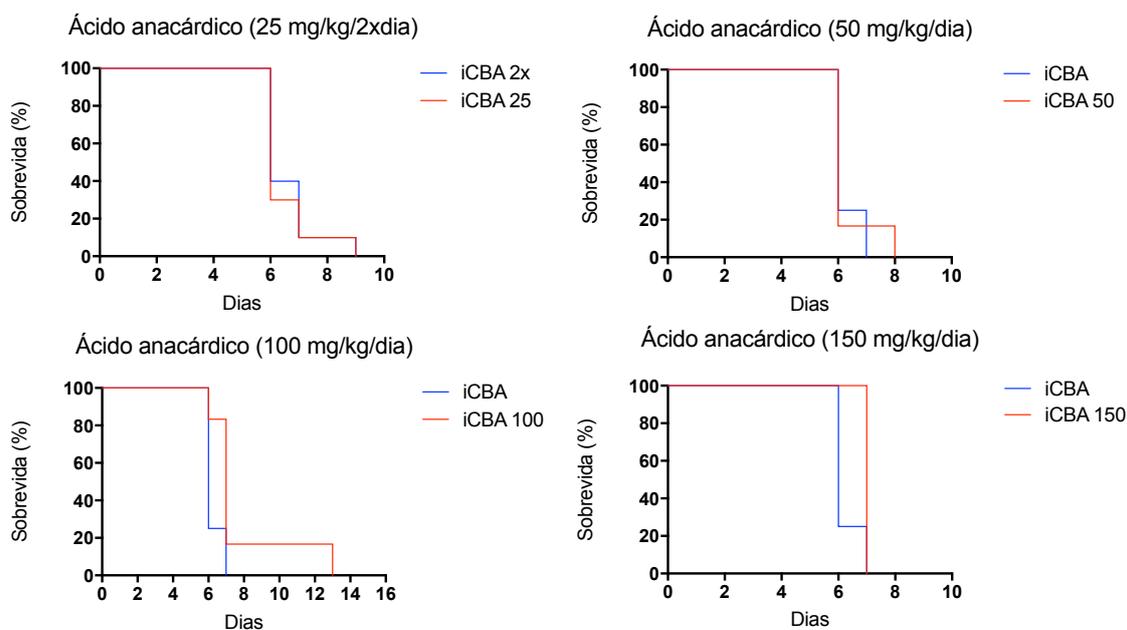


Figura 5: Tratamento dos animais CBA. A) Tratamento com 25 mg/kg/dia (iCBA 25 n = 10). O ácido anacárdico não modificou a sobrevivência na dada concentração em comparação com o grupo controle 2x. (iCBA 2x n=10 e p = 0,7781). B) Tratamento com 50 mg/kg/dia (iCBA 50 n = 6). Nesta concentração o ácido anacárdico não influenciou na sobrevivência dos animais em comparação com o grupo controle (iCBA n = 8 e p = 0,9093). C) O tratamento com 100 mg/kg/dia (iCBA 100 n = 7), o ácido anacárdico aumentou em até 6 dias a sobrevivência dos animais tratados (p = 0,03). D) A concentração de 150mg/kg/dia (iCBA150 n = 10) de ácido anacárdico aumentou em 1 dia a sobrevivência dos animais tratados (p = 0,001).

Nos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 o ácido anacárdico não teve efeito na sobrevivência em nenhuma das doses testadas (Figura 6 e 7).

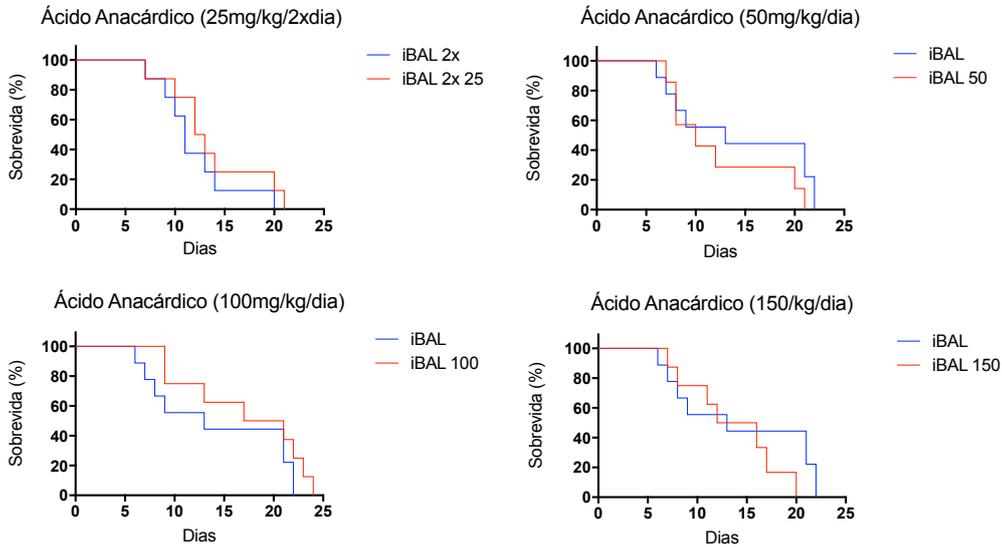


Figura 6: Efeito do tratamento nos animais BALB/c com ácido anacárdico nos grupos controle 2x (iBAL 2x n = 8) e controle (iBAL n=8) e nas concentrações de 25 mg/kg 2x ao dia (n = 8 e p = 0,33) 50 (n = 7 e p = 0,27) 100 (n = 8 e p = 0,21) e 150mg/Kg/dia (n = 7 e p = 0,88). Os tratamentos não influenciaram as sobrevivências dos animais.

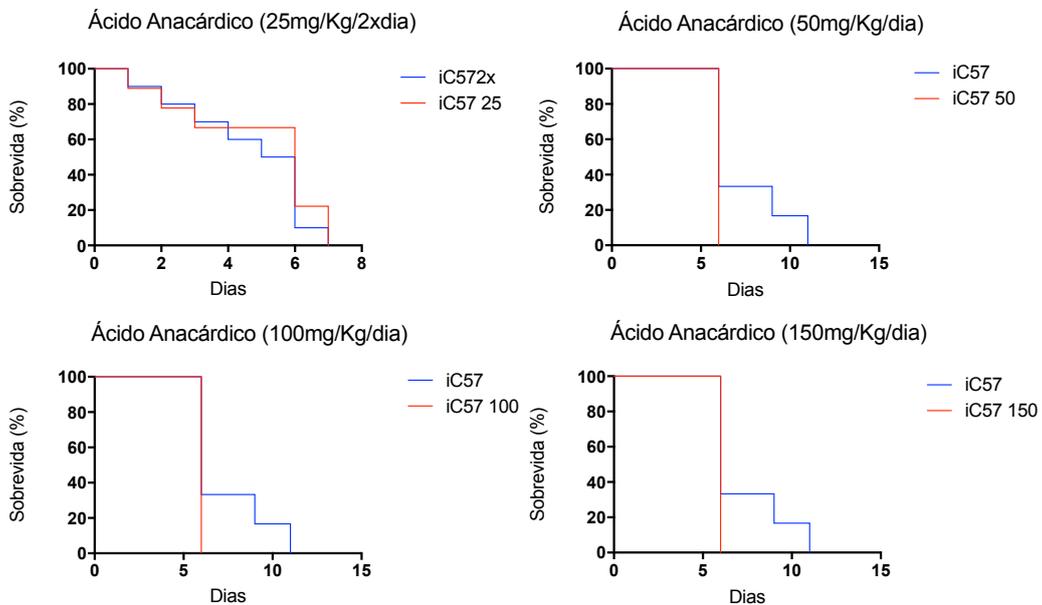


Figura 7: Efeito do tratamento nos animais C57BL/6 com ácido anacárdico nos grupos controle 2x (iC57 n = 10) e controle (iC57 n = 6) e nas concentrações de 25 mg/kg 2x ao dia (n = 10 e p = 0,46), 50 (n = 7 e p = 0,07), 100 (n = 6 e p = 0,14), e 150mg/Kg/dia (n = 7 e p = 0,11). Os tratamentos não influenciaram as sobrevivências dos animais.

## Efeito do ácido anacárdico no hematócrito dos camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

Para avaliar o efeito do ácido anacárdico sobre a anemia dos animais com malária, foi realizado o hematócrito nos dias 3, 6 e 8 após a infecção. Os animais das três linhagens utilizadas foram infectados e tratados. No 3º, 6º e 8º dia de infecção o sangue foi retirado da ponta da cauda para realização do hematócrito.

Nossos dados mostraram que no terceiro dia da infecção, o comprometimento do hematócrito foi menor nos animais da linhagem CBA quando tratado com 50 mg/kg/dia de ácido anacárdico em relação ao grupo não tratado ( $p = 0,0437$ ), em relação ao tratamento com 100 mg/kg/dia ( $p = 0,0096$ ) e 150 mg/kg/dia ( $p = 0,0006$ ) de ácido anacárdico. Entretanto, no sexto dia, não observamos mais essa diferença entre os hematócritos dos grupos avaliados ( $p=0,2822$ ) teste ANOVA. Não foi feita a avaliação do hematócrito dos camundongos CBA no 8ª dia por não haver animais sobreviventes suficientes para avaliação estatística. (Figura 8).

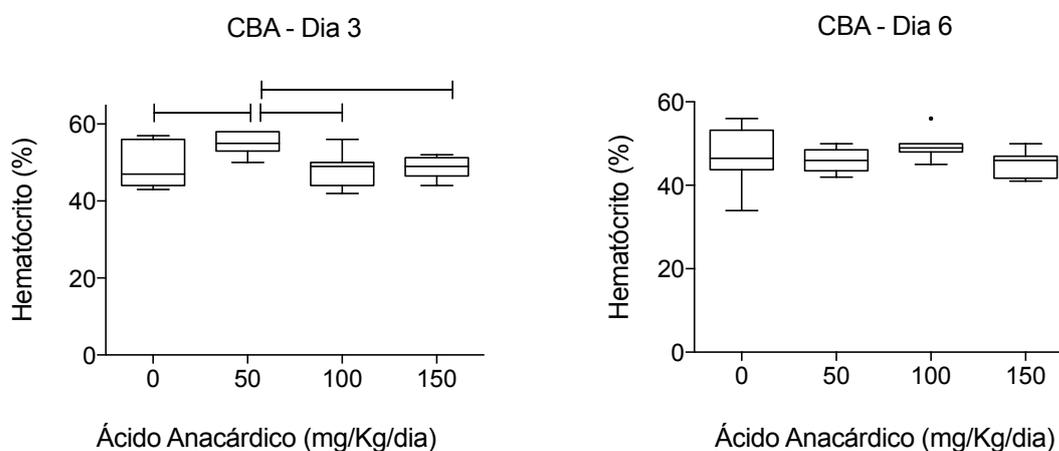


Figura 8: Efeito do tratamento com ácido anacárdico no hematócrito dos animais CBA. No terceiro dia os animais tratados com 50mg/kg/dia ( $n = 6$ ) tiveram um menor comprometimento no hematócrito comparado ao grupo controle ( $n = 8$ ) ( $p = 0,0437$ ) e aos grupos tratados com 100mg/kg/dia ( $n = 7$  e  $p = 0,0096$ ) e 150mg/kg/dia ( $n = 10$  e  $p = 0,0006$ ).

Para os camundongos da linhagem BALB/c, observamos que o hematócrito foi menos comprometido apenas no oitavo dia da infecção, sendo que os animais tratados com 50 mg/kg/dia de ácido anacárdico mostrou o

hematócrito maior do que os animais tratados com 100 mg/kg/dia de ácido anacárdico ( $p = 0,0229$ ) (Figura 9).

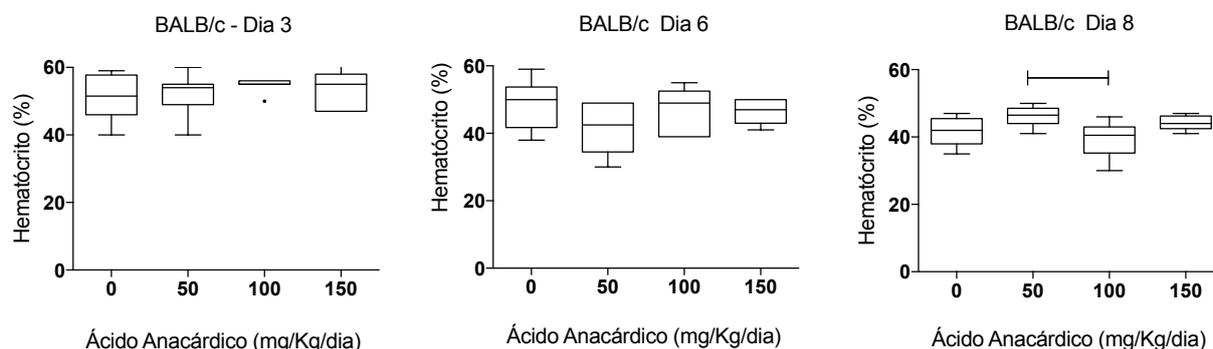


Figura 9: Efeito do tratamento com ácido anacárdico no hematócrito dos animais BALB/c.  $n_0 = 8$ ;  $n_{50} = 7$ ;  $n_{100} = 8$ ;  $n_{150} = 7$ . No oitavo dia os animais tratados com 50 mg/kg/dia tiveram um menor comprometimento no hematócrito comparado ao grupo tratado com 100 mg/kg/dia ( $p = 0,0229$ ).

Os animais C57BL/6, entretanto não apresentaram diferença no hematócrito em nenhuma das doses utilizadas. Não foi feita a avaliação do hematócrito dos camundongos C57BL/6 no 8ª dia por não haver sobreviventes suficientes para avaliação estatística (Figura 10).

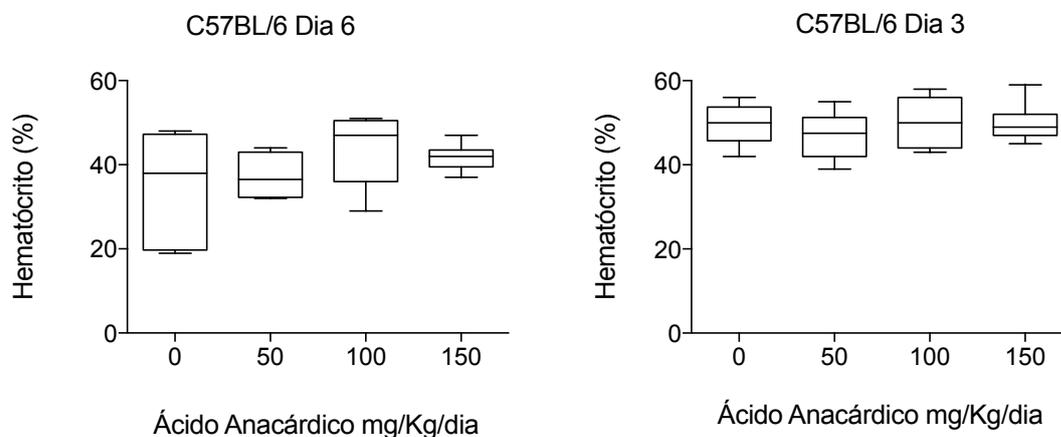


Figura 10: Efeito do tratamento com ácido anacárdico no hematócrito dos animais C57BL/6.  $n_0 = 6$ ;  $n_{50} = 7$ ;  $n_{100} = 6$ ;  $n_{150} = 7$ . Não houve diferença do hematócrito entre nenhum dos grupos no terceiro dia ( $p = 0,6154$ ). O mesmo ocorreu no sexto dia ( $p = 0,3899$ ).

### Efeito do ácido anacárdico na parasitemia dos camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) à malária cerebral.

Para avaliar o efeito do ácido anacárdico sobre o crescimento parasitário do *Plasmodium berghei* ANKA nos animais, foi realizado a parasitemia nos dias 3, 6 e 8 após a infecção. Os animais das três linhagens utilizadas foram

infectados e tratados. No 3º, 6º e 8º dia de infecção o sangue foi retirado da ponta da cauda para realização distendido sanguíneo para avaliação da parasitemia.

Nossos dados mostraram que no terceiro dia de infecção nenhum dos grupos mostrou diferenças estatísticas entre as parasitemias. Nos modelos CBA (Figura 11) e BALB/c (Figura 12) o tratamento com ácido anacárdico em nenhuma das doses afetou a evolução da parasitemia em relação ao grupo controle. Não foi feita a avaliação da parasitemia dos camundongos CBA no 8ª dia por não haver sobreviventes suficientes para avaliação estatística.

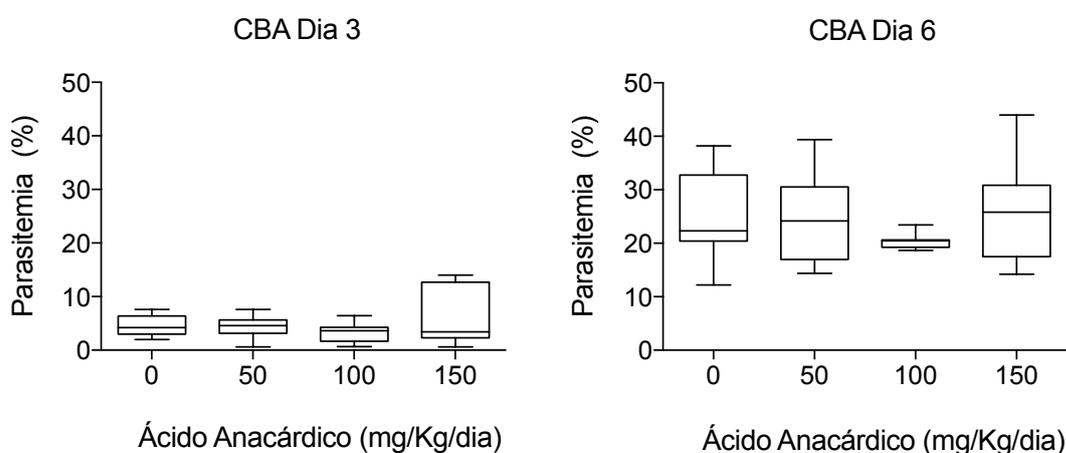


Figura 11: Efeito do tratamento com ácido anacárdico na parasitemia dos animais CBA no terceiro e sexto dia. n0 = 8; n50 = 6; n100 = 7 e n150 = 10. Não houve diferença estatística da parasitemia entre os grupos em nenhuma das doses em nenhum dos dias avaliados ( $p = 0,5786$ ;  $p = 0,5067$  respectivamente)

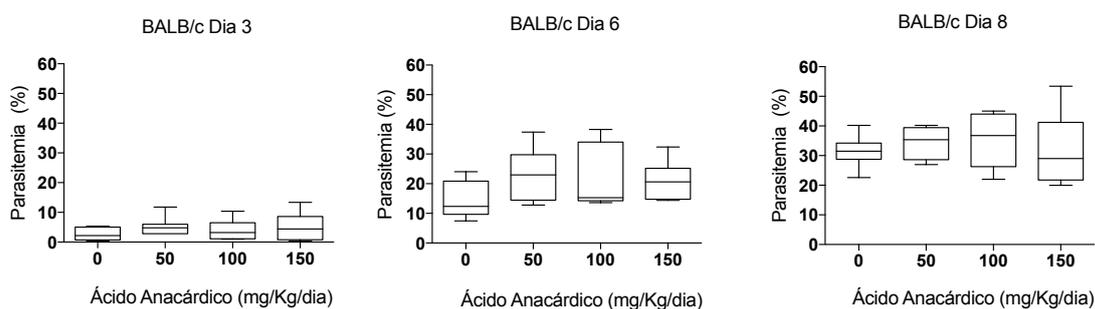


Figura 12: Efeito do tratamento com ácido anacárdico na parasitemia dos camundongos BALB/c no terceiro, sexto e oitavo dia. 3º e 6º dia: n0 = 8; n50 = 7; n100 = 8 e n150 = 7. 8º dia: n0 = 6; n50 = 4; n100 = 5 e n150 = 5. Não houve diferença estatística da parasitemia entre os grupos em nenhuma das doses em nenhum dos dias avaliados ( $p = 0,4572$ ;  $p = 0,2149$ ;  $p = 0,5662$  respectivamente)

Porém no sexto dia da infecção, a parasitemia dos animais C57BL/6 tratados com 150mg/kg/dia de ácido anacárdico estava menos avançada comparada com o grupo controle ( $p = 0,0237$ ) (Figura 13). Não foi feita a avaliação da parasitemia dos camundongos C57BL/6 no 8ª dia por não haver sobreviventes suficientes para avaliação estatística.

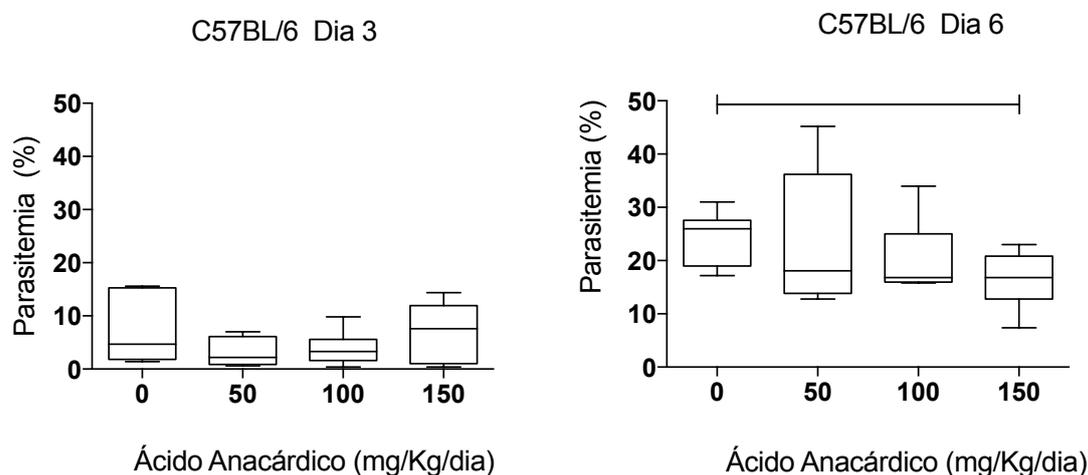


Figura 13: Efeito do tratamento com ácido anacárdico na parasitemia dos animais C57BL/6.  $n_0 = 6$ ;  $n_{50} = 7$ ;  $n_{100} = 6$  e  $n_{150} = 7$ ). No sexto dia de infecção os animais tratados com 150mg/kg/dia apresentaram parasitemia menor comparada ao grupo controle ( $p = 0,0128$ )

### **Efeito do ácido anacárdico sobre o peso dos camundongos susceptíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) a malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.**

Para avaliar o efeito do ácido anacárdico no peso dos camundongos, foi realizado a mensuração do peso diariamente desde o dia zero até o dia de sua morte espontânea. O peso foi aferido sempre no mesmo horário e mesmo equipamento. Para verificar de uma forma mais precisa a perda de peso foi utilizada a expressão de peso final (Pf) subtraído do peso inicial (Pi) dividido pelo peso inicial.  $\Delta\% = (Pf - Pi) / Pi$ . Não houve diferença estatística no peso inicial de nenhuma das linhagens de murinos avaliadas (Figura 14).

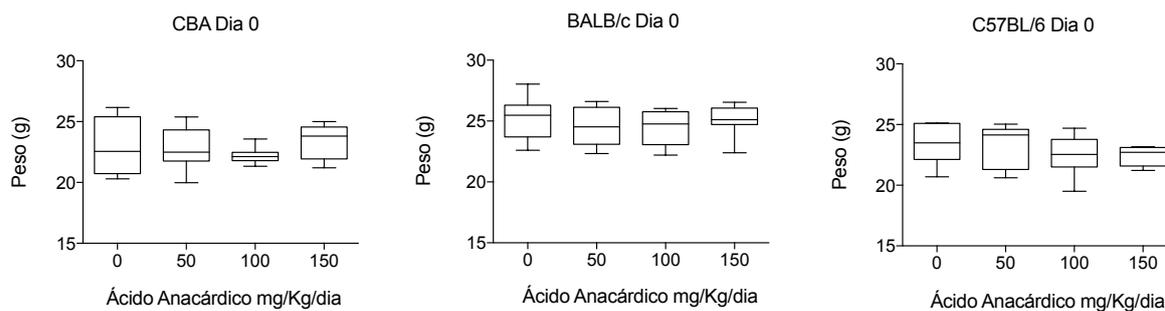


Figura 14: Peso dos camundongos no dia zero. Não houve diferença estatística entre os pesos dos animais no início do experimento em nenhuma das linhagens avaliadas (CBA: n0 = 8; n50 = 6; n100 = 7 e n150 = 10. BALB/c: n0 = 8; n50 = 7; n100 = 8 e n150 e C57BL/6: n0 = 6; n50 = 7; n100 = 6 e n150 = 7).

Nossos dados mostraram que a perda de peso dos animais BALB/c tratados com dose de 150 mg/kg diário tiveram menor comprometimento do peso nos dias 7,8 e 9 em relação aos outros grupos. Os animais com dose de 100mg/kg diário perderam menos peso no 21º dia em relação ao grupo controle. Os camundongos CBA tratados com 150 mg/kg diário tiveram menor comprometimento de peso no 6º dia de infecção comparado ao grupo controle e tratado com 50 mg/kg/dia (Figura 15). Os camundongos C57BL/6 tratados não apresentaram diferença na perda de peso em relação ao controle em nenhum dos dias

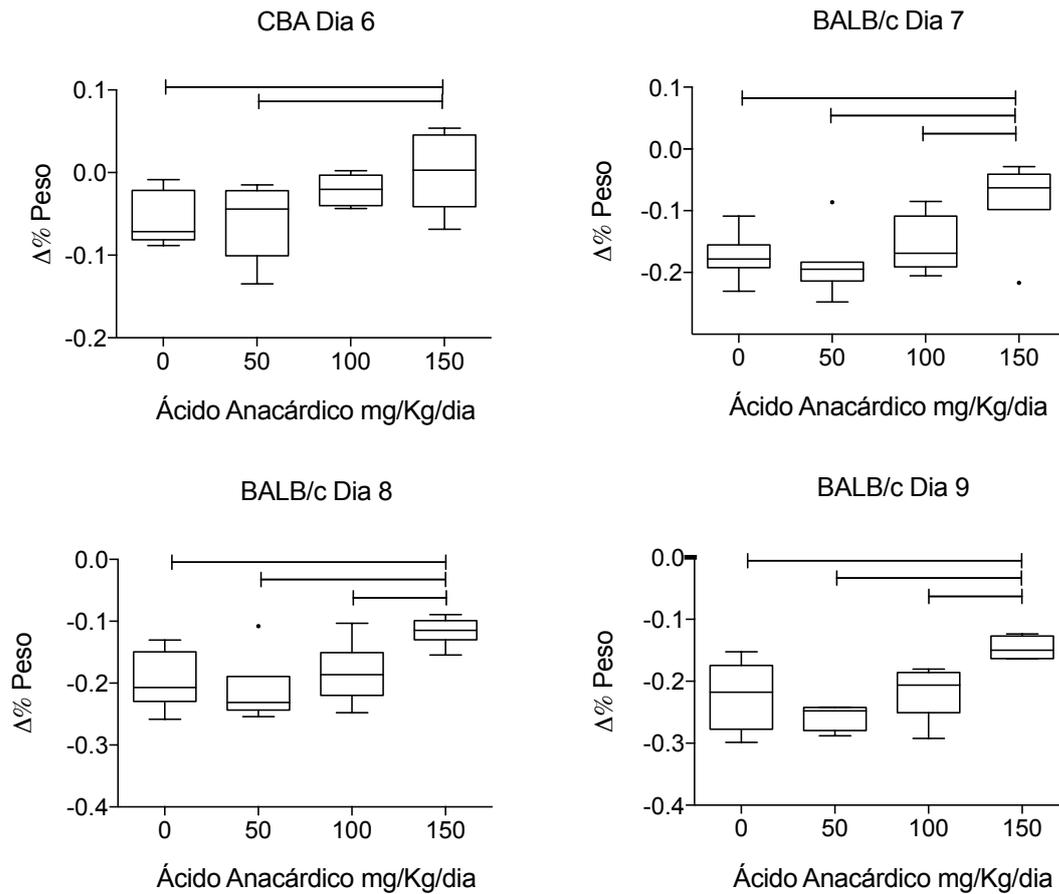


Figura 15: Efeito do tratamento com ácido anacárdico na perda de peso dos animais. A) Diferença da perda de peso dos animais CBA no 6º dia de infecção. Os animais tratados com 150 mg mostraram diferença de perda de peso inferior aos grupos controle e tratado com 50 mg/kg/dia (n0 = 8; n50 = 6; n100 = 7; n150 = 10 e p = 0,05). B, C e D: Diferença da perda de peso dos animais BALB/c nos dias 7 (n0 = 7; n50 = 7; n100 = 8; n150 = 7), 8 (n0 = 6; n50 = 6; n100 = 8; n150 = 6) e 9 (n0 = 5; n50 = 4; n100 = 8; n150 = 5) de infecção respectivamente. Os animais tratados com 150 mg/kg/dia mostraram diferença na perda de peso inferior em relação aos demais grupos (p = 0,0024; p = 0,0051; p = 0,0075 respectivamente).

A seguir a representação das curvas de sobrevivência das linhagens CBA, BALB/c e C57BL/6 (Figura 16,17 e 18).

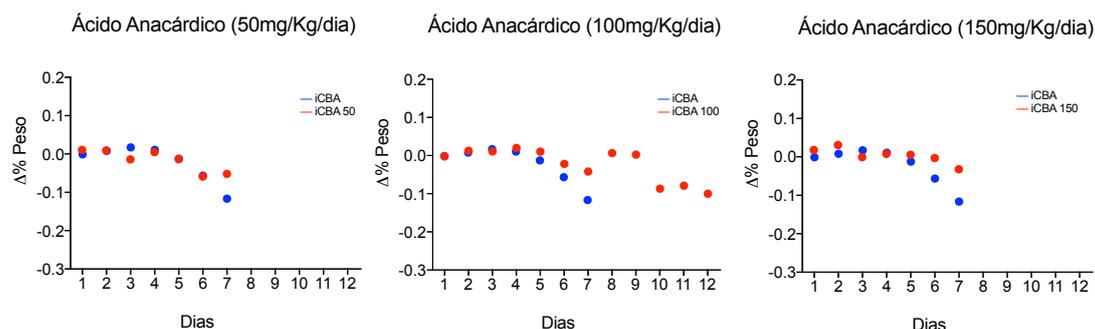


Figura 16: Perda progressiva de peso dos animais CBA controle e tratados com ácido anacárdico. A) Animais controle e tratados com 50 mg/kg/dia de ácido anacárdico. B) Animais controle e tratados com 100 mg/kg/dia de ácido anacárdico. C) Animais controle e tratados com 150 mg/kg/dia. No sexto dia os animais tratados com 150 mg/kg/dia mostraram menor perda de peso comparado ao grupo controle ( $p=0,05$ ).

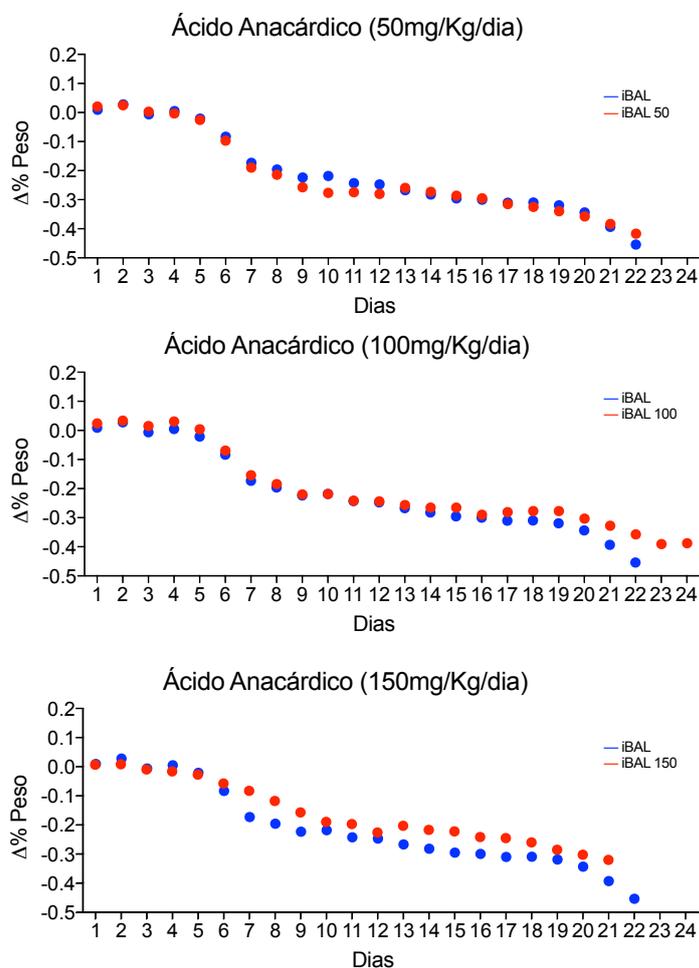


Figura 17: Perda progressiva de peso dos animais BALB/c controle e tratados com ácido anacárdico. A) Animais controle e tratados com 50 mg/kg/dia de ácido anacárdico. B) Animais controle e tratados com 100 mg/kg/dia de ácido anacárdico. C) Animais controle e tratados com

150 mg/kg/dia. Os animais tratados com 150 mg/kg/dia mostraram diferença na perda progressiva de peso em relação aos demais grupos nos dias 7, 8 e 9 ( $p = 0,0024$ ;  $p = 0,0051$ ;  $p = 0,0075$  respectivamente).

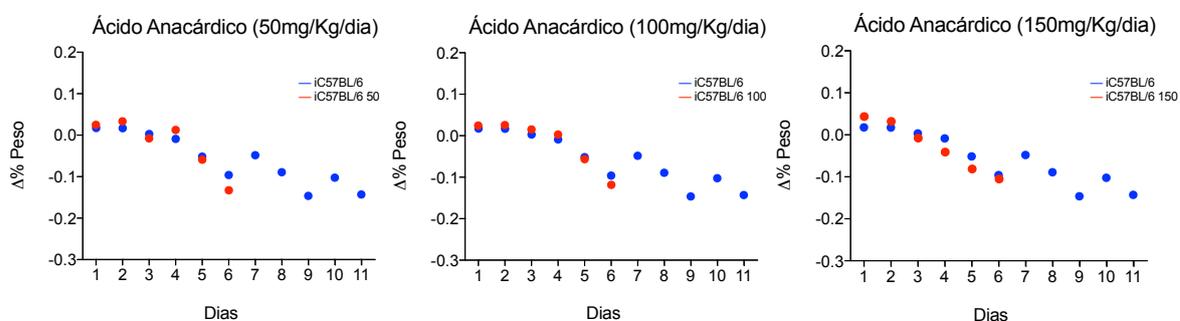


Figura 18: Perda progressiva de peso dos animais BALB/c controle e tratados com ácido anacárdico. A) Animais controle e tratados com 50 mg/kg/dia de ácido anacárdico. B) Animais controle e tratados com 100 mg/kg/dia de ácido anacárdico. C) Animais controle e tratados com 150 mg/kg/dia. Não houve diferença estatística na perda progressiva de peso dos animais C57BL/6.

### Efeito de diferentes concentrações do ácido anacárdico na viabilidade das células J774 em cultura.

Os ensaios de viabilidade foram realizados pelo método de redução do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}. As diferentes concentrações utilizadas de ácido anacárdico (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 e 0,78  $\mu\text{M}$ ) não modificaram a viabilidade das células J774 (Figura 19), analisada pela função mitocondrial das células J774 em comparação com o metabolismo basal das células sem tratamento. Também foi avaliado se o meio com 1% de DMSO não causou prejuízo na função mitocondrial das células, para verificar se o seu uso para a solubilização da droga não influenciou o metabolismo mitocondrial das células. Nossos dados mostraram que a utilização do DMSO 1%, como diluente, não afetou o metabolismo mitocondrial quando comparado ao controle basal (Figura 19).

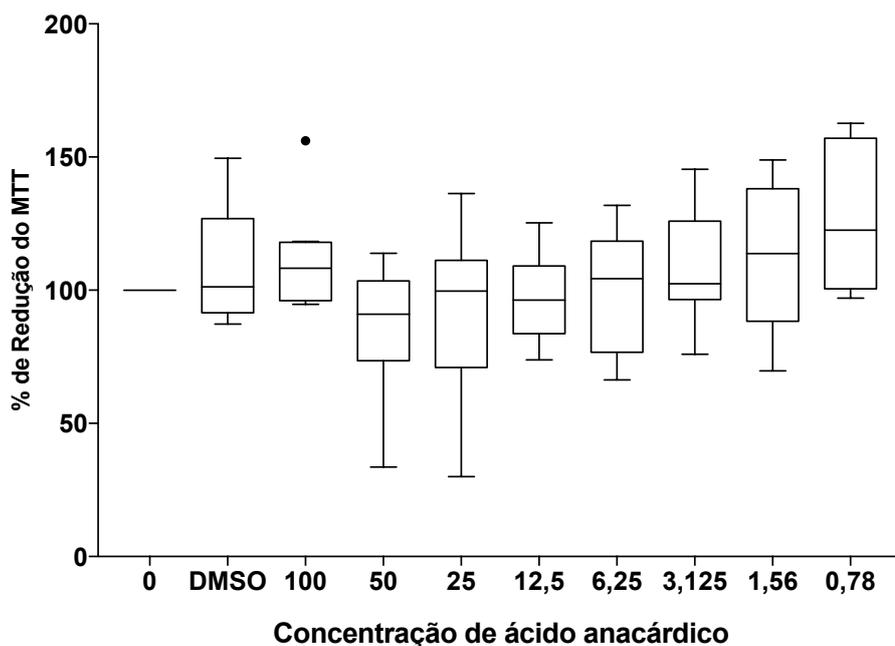


Figura 19: Efeito das diferentes concentrações do ácido ascórbico nas células J774, após incubação de 24 horas, na presença de 10 µl de solução MTT (5 mg/ml). Os resultados mostraram que as concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 e 0,78 µM da droga não modificaram estatisticamente o metabolismo mitocondrial das células J774 em comparação ao metabolismo basal ( $p > 0,05$ ). A utilização do DMSO 1%, como diluente, não afetou o metabolismo mitocondrial quando comparado ao controle basal ( $p > 0,05$ ).

### **Influência do ácido ascórbico sobre a expressão de corpúsculos lipídicos, avaliado pela coloração com *oil red O***

Nossos dados mostraram que o tratamento das células J774 com 50 µM do ácido ascórbico aumentou o índice corpuscular das células J774 (7,1 para 15;  $p = 0,05$ , Mann-Whitney) (Figura 20B), tanto pelo aumento da média dos corpúsculos lipídicos expressos por célula J774 (Figura 20C) (0,5 para 0,83;  $p = 0,05$ , teste t), quanto pelo maior número de células expressando a organela (14,5 para 22;  $p = 0,02$ , teste t) (Figura 20A).

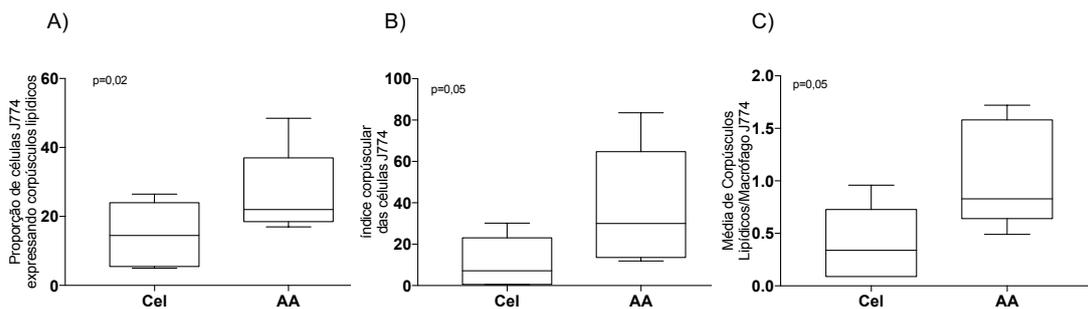


Figura 20: Influência de ácido anacárdico (AA) sobre a expressão de corpúsculos lipídicos por células J774, avaliados com coloração pelo *oil red O*. A) Proporção de macrófagos J774 expressando corpúsculos lipídicos após estímulo com eritrócitos parasitados ou não. (AA > C; p = 0,02, teste t). B) Índice corpuscular das células J774 (AA > C, p=0,02, Mann-Whitney). C) Média de corpúsculos lipídicos expressos pelas células J774 após estímulo com eritrócitos parasitados ou não. (AA > C; p = 0,05, teste t).

Avaliamos também se a presença de eritrócitos normais ou parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA influenciam a expressão de corpúsculos lipídicos nos macrófagos J774. Observamos que tanto os eritrócitos normais quanto os parasitados aumentaram a expressão dos corpúsculos lipídicos nas células J774. Houve aumento do índice corpuscular na presença de eritrócitos normais de 7,1 para 44,3 (0,03, Mann-Whitney) e na presença dos eritrócitos parasitados para 137,3 (p = 0,022, ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação múltipla) (Figura 21C). O aumento do índice corpuscular deveu-se tanto ao aumento da proporção de células J774 expressando corpúsculos lipídicos (Figura 21A), quanto ao maior número de corpúsculos expressos por célula (Figura 21B).

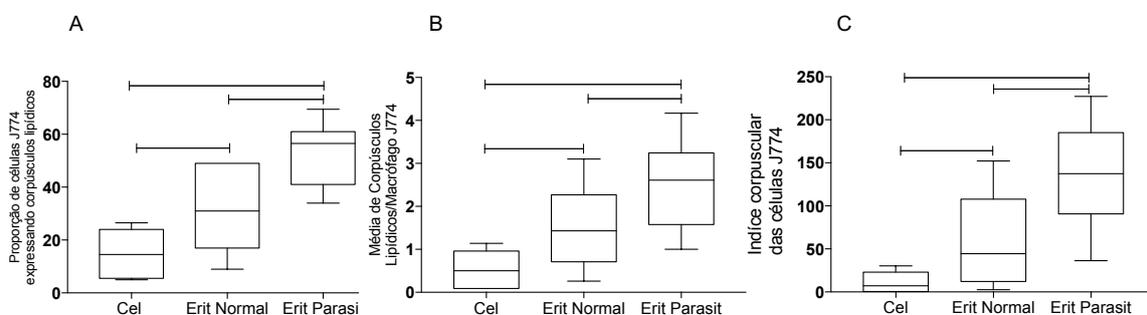


Figura 21: Influência de eritrócitos parasitados (EP) ou não (EN) sobre a expressão de corpúsculos lipídicos por células J774, avaliados pela coloração pelo *oil red O*. A) Proporção de

macrófagos J744 expressando corpúsculos lipídicos após estímulo com eritrócitos parasitados ou não. (EP > EN e C; EM > C;  $p = 0,0001$ , ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para comparação múltipla). B) Média de corpúsculos lipídicos expressos pelas células J744 após estímulo com eritrócitos parasitados ou não. (EP > C;  $p = 0,031$ , Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla. C) Índice corpuscular das células J744 (EP > EN e C, ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para comparação múltipla; EM > C,  $p = 0,03$ , Mann-Whitney).

Para verificar se o somatório de estímulos influenciava a expressão de corpúsculos lipídicos pelas células J774, avaliamos as células estimuladas com AA e/ou LPS e/ou EP. Observamos que embora isoladamente os eritrócitos parasitados (EP) tenham elevado o índice corpuscular, quando foi associado ao sistema o AA, observamos uma diminuição da expressão dos corpúsculos lipídicos pelas células J774 (de 137,3 para 10,5,  $p = 0,003$ , Mann-Whitney) (Figura 18C). No entanto, quando as células foram intensamente estimuladas com os EP mais o LPS e mais o AA, houve aumento expressivo do índice corpuscular (de 7,1 para 547,9;  $p = 0,0001$ , ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas) (Figura 22C). Essa resposta deveu-se tanto à maior expressão de corpúsculos lipídicos por célula (Figura 22B), quanto ao maior número de células expressando corpúsculos lipídicos (Figura 22A). Sendo as respostas de ambos semelhantes ao observado para o Índice Corpuscular (Figura 22C).

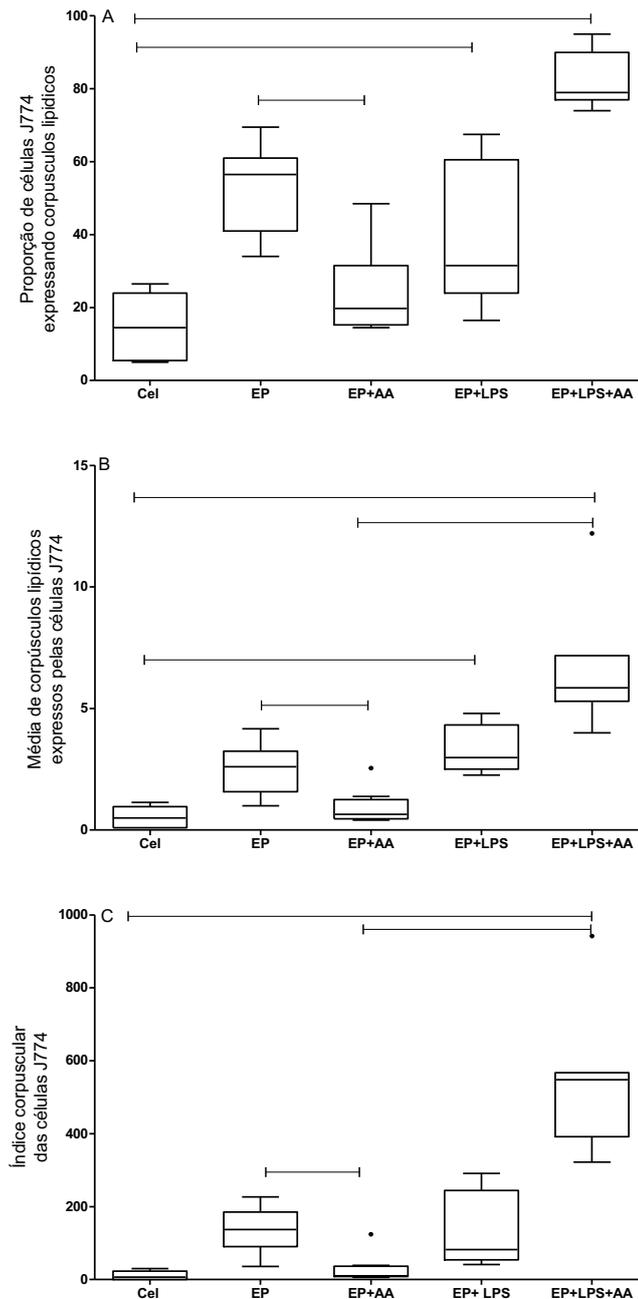


Figura 22: Influência de estímulo com AA, EP e LPS, associados ou não, sobre a expressão de corpúsculos lipídicos por células J774, avaliados pela coloração pelo *oil red O*. A) Proporção de macrófagos J774 expressando corpúsculos lipídicos após estímulo com eritrócitos parasitados ou não. (EP + LPS + AA > Cel; EP+LPS>Cel; EP+AA < EP;  $p = 0,0001$ , ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para comparação múltipla). B) Média de corpúsculos lipídicos expressos pelas células J774 após estímulo com eritrócitos parasitados ou não. (EP + LPS + AA > C;  $p = 0,0001$ , Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla; EP + AA < EP,  $p = 0,003$ , teste t). C) Índice corpuscular das células J774 (EP + LPS + AA > Cel;  $p < 0,0001$ , ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para comparação múltipla; EP + AA < EP  $p = 0,002$ , teste t).

Em conclusão, nossos dados mostraram que o AA estimula a expressão de corpúsculos lipídicos, e que eritrócitos normais e parasitados também estimulam o aumento da sua expressão pelas células J774. Entretanto, quando os EP estão associados com o AA, há uma inibição desse aumento. Porém, observamos também que na associação de vários estímulos, pela associação do AA com o LPS e com o EP ocorre intensa expressão dos corpúsculos lipídicos pelas células J774. Esse efeito foi determinado tanto pelo maior número de células J774 expressando os corpúsculos lipídicos como também pela maior expressão dos corpúsculos lipídicos por cada célula.

#### **Efeito do ácido anacárdico sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos J774.**

Foi avaliado o efeito do ácido anacárdico na produção de óxido nítrico pelos macrófagos J774 na presença de hemácias normais e hemácias parasitadas, sendo que o LPS foi usado LPS como estímulo e como controle positivo do teste.

O ácido anacárdico isoladamente não alterou a produção basal de óxido nítrico pelas células J774 ( $p = 0,8087$ ) (Figura 23). Porém, ao acrescentar eritrócitos normais às células tratadas com ácido anacárdico, houve diminuição na produção do óxido nítrico ( $p = 0,0493$ ) (Figura 24).

Eritrócitos parasitados não modificaram a produção basal do NO pelos macrófagos J744. Entretanto, quando as células foram estimuladas com os eritrócitos parasitados e o LPS, a presença do AA no meio impediu o aumento da produção do NO determinada pelo LPS ( $p = 0,4$ ; teste t com correção de Welch).

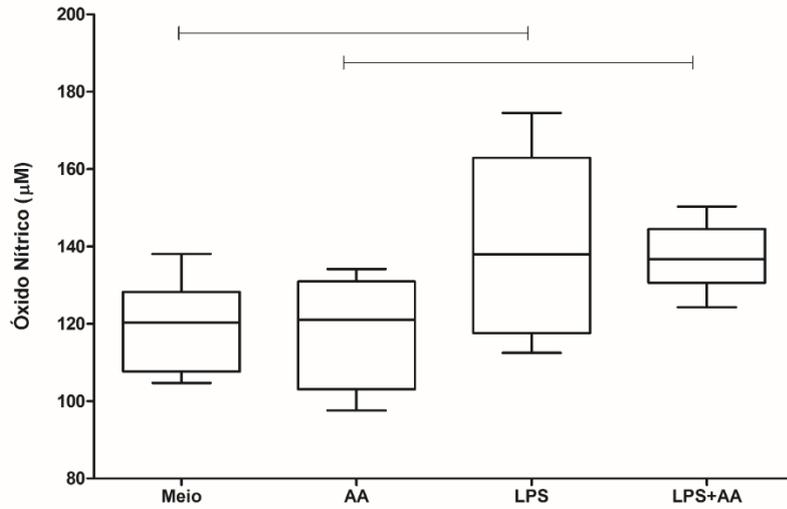


Figura 23: Influência do ácido anacárdico sobre a produção de óxido nítrico (NO) pelas células J774 *in vitro*. O AA não modificou a produção de NO pelas células J774,  $p = 0,8$ ; teste t. O LPS + AA > AA,  $p = 0,01$ , Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação múltipla. LPS>meio,  $p = 0,03$ , teste t.

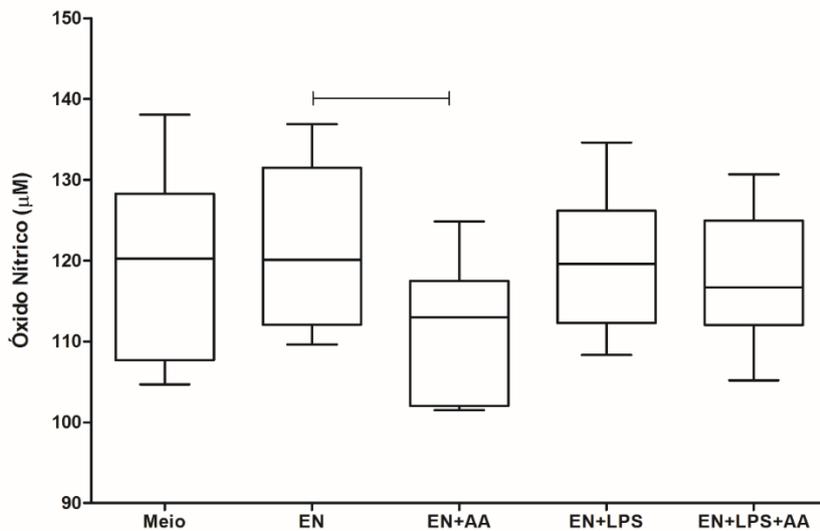


Figura 24: Influência do ácido anacárdico sobre a produção de óxido nítrico (NO) pelas células J774 *in vitro* na presença de eritrócitos normais. O AA, diminuiu a produção do NO na presença de EN. ( $p = 0,04$  teste t).

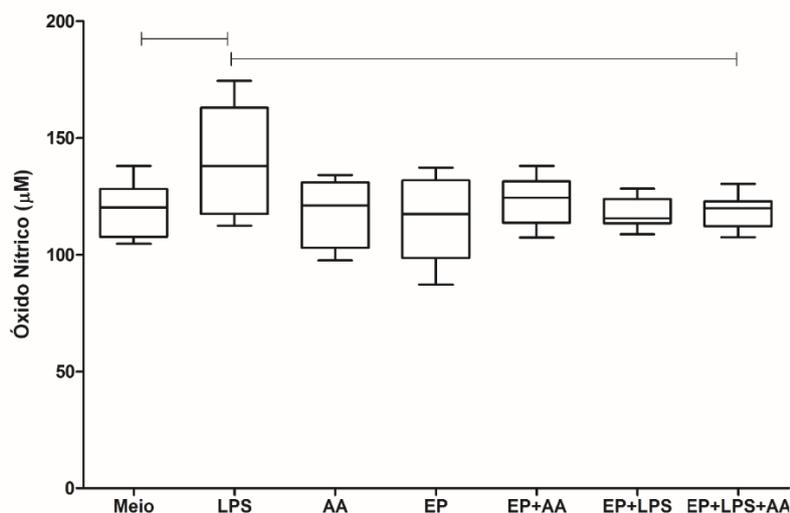


Figura 25. Influência do ácido anacárdico sobre a produção de óxido nítrico (NO) pelas células J774 *in vitro* na presença de eritrócitos parasitados. O tratamento das células estimuladas com o LPS mais os EP com AA associado impediu o aumento determinado pelo LPS no NO ( $p = 0,04$  teste t).

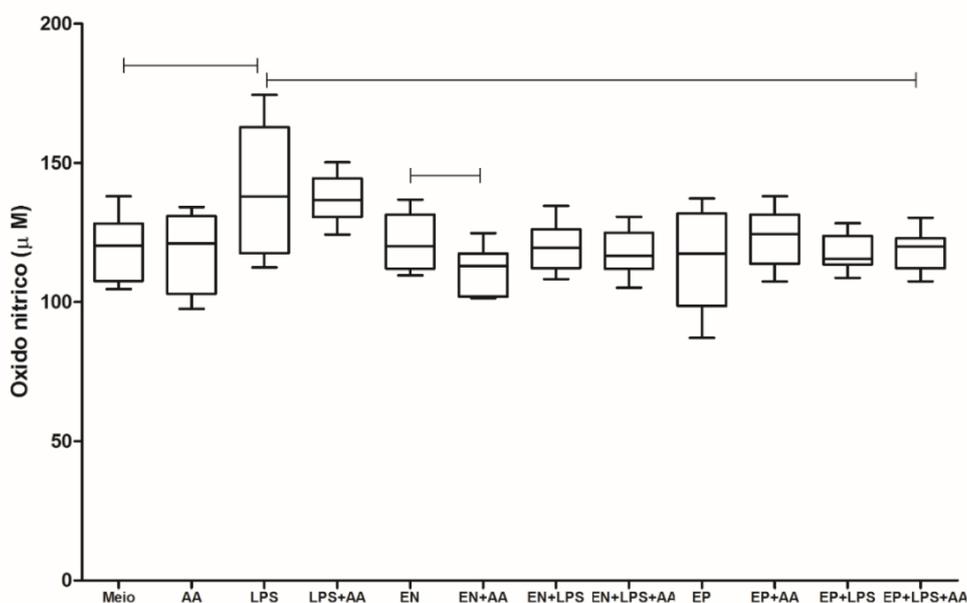


Figura 26. Análise comparativa dos vários estímulos (AA, EN, EP e LPS) isolados ou associados sobre a produção do NO.

Em conclusão, nossos dados mostraram que o AA modula negativamente a produção do NO quando associado com eritrócitos normais e que o AA impede o aumento da produção do NO determinada pelo LPS quando associado aos eritrócitos parasitados.

**Influência do ácido anacárdico sobre a produção de fator de necrose tumoral- $\alpha$  pelas células J774 estimuladas *in vitro* com eritrócitos parasitados ou não de camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) a malária cerebral.**

Observamos que o tratamento com 50 $\mu$ M de AA não modificou a produção basal de fator de necrose tumoral (10,3 pg/mL versus 23,42 pg/mL, respectivamente;  $p > 0,5$ ). As células J744 tratadas com LPS (195,4 pg/mL) aumentaram em 8,3 vezes a produção do FNT- $\alpha$  em relação ao controle apenas com o meio de cultura (23,42 pg/mL). E as células tratadas com o LPS+AA (186 pg/mL) aumentaram em 18 vezes a produção de FNT- $\alpha$  em relação as células tratadas apenas com AA (10,30 pg/mL). Entretanto, não houve diferença entre aquelas tratadas apenas com o LPS e aquelas em que o AA e o LPS foram adicionados à cultura ( $p = 0,047$ , Kruskal-Wallis) (Figura 27).

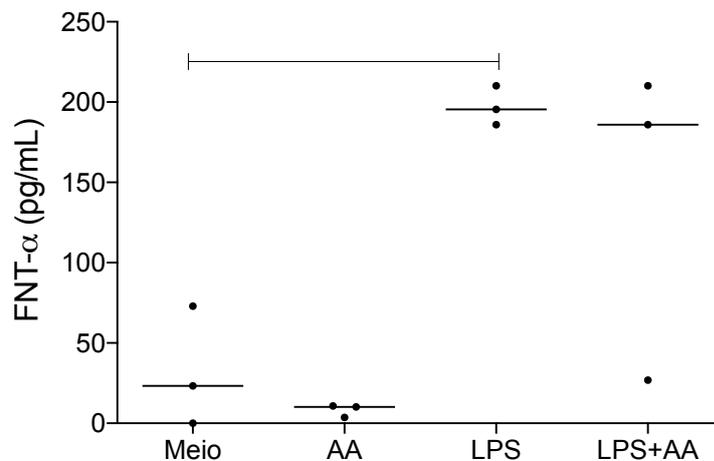


Figura 27: Influência do ácido anacárdico na produção de fator de necrose tumoral pelas células J774. A produção de FNT foi mais elevada nas células tratadas com LPS e com LPS+AA do que as células não estimuladas ou estimuladas apenas pelo AA ( $p = 0,04$ , Kruskal-Wallis).

Avaliamos também a produção de FNT- $\alpha$  pelas J774 estimuladas com eritrócitos de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, susceptíveis ou não a malária cerebral, obtidos no 6º dia de infecção. Quando foi associado ao sistema eritrócitos parasitados ou não dos camundongos

BALB/c, C57BL/6 e CBA associados ou não ao AA não houve interferência na produção do FNT- $\alpha$  pelas células J744 ( $p > 0,05$ ) (Figura 28).

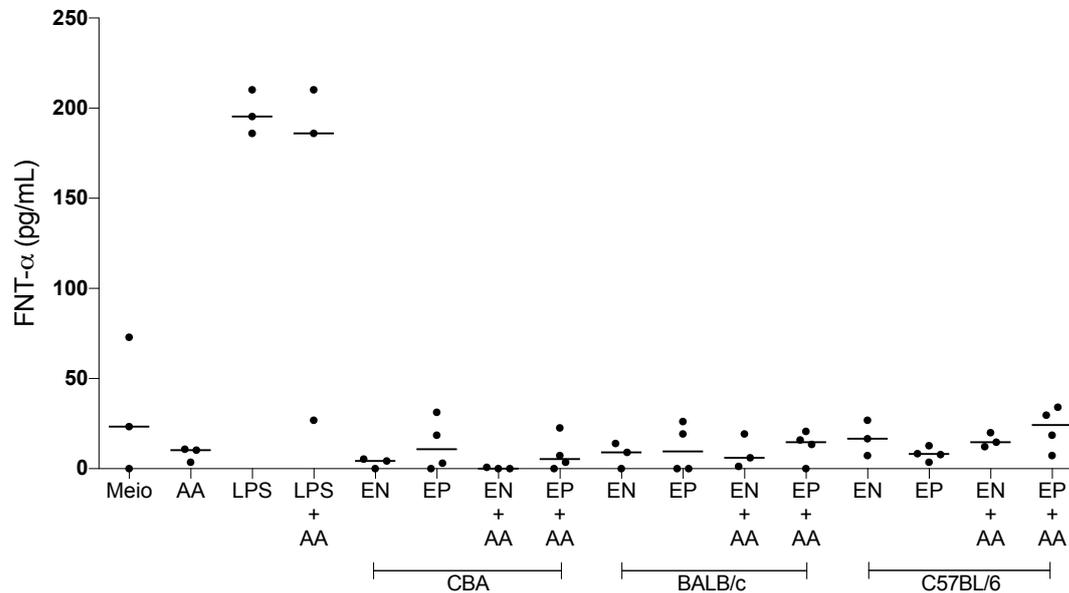


Figura 28: Influência do ácido anacárdico na produção de FNT- $\alpha$  pelas células J774 estimuladas com eritrócitos parasitados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA. Em A. Eritrócitos parasitados ou não obtidos de camundongos CBA. Em B foram utilizados eritrócitos de camundongos BALB/c e em C foram utilizados eritrócitos de camundongos C57BL/6 ( $p > 0,05$ ).

### **Influência do ácido anacárdico sobre a produção MCP-1 pelas células J774 estimuladas *in vitro* com eritrócitos parasitados ou não de camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) a malária cerebral.**

Observamos que o tratamento com 50  $\mu$ M de AA não modificou a produção basal de MCP-1, porém as células estimuladas com LPS e tratadas com AA (4682) aumentaram em 19 vezes a produção de MCP-1 em relação a produção basal (1337) ( $p < 0,0001$ , Kruskal-Wallis) (Figura 29).

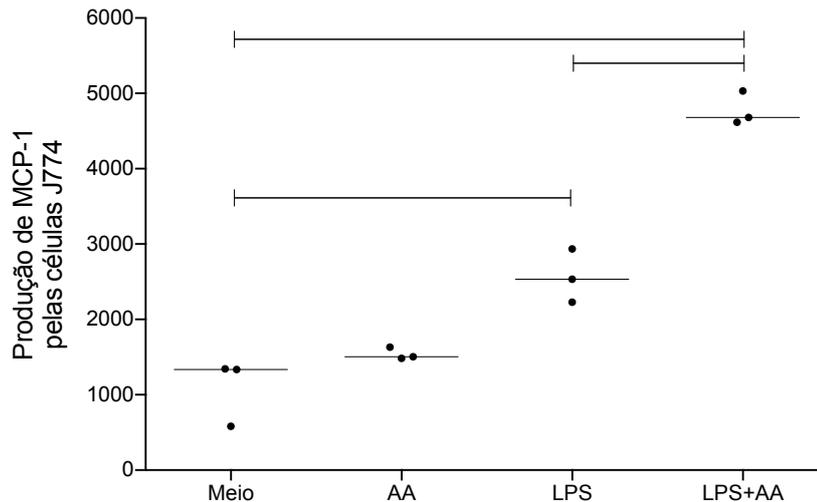


Figura 29: Influência do ácido anacárdico na produção de MCP-1 pelas células J774 *in vitro*. O AA aumentou a produção de MCP-1 pelas células estimuladas com LPS (LPS + AA > LPS; ( $p < 0,0001$ , Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação múltipla).

Também foi avaliada a produção de MCP-1 pelas J774 estimuladas com eritrócitos obtidos de camundongos infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA, susceptíveis ou não a malária cerebral, obtidas no 6º dia de infecção.

Quando as células J744 foram estimuladas com eritrócitos parasitados obtidos dos camundongos BALB/c observou-se diminuição da produção de MPC-1 em relação às células estimuladas com os eritrócitos não parasitados (EN>EP). Quando o AA foi adicionado ao sistema, essa diminuição não foi mais observada (EP + AA > EP) ( $p = 0,0018$ , Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação múltipla). Quando foi adicionado ao sistema eritrócitos parasitados ou não obtidos de camundongos susceptíveis à forma cerebral da malária, não houve nenhuma alteração na produção do MCP-1 ( $p > 0,05$ ) (Figura 30).

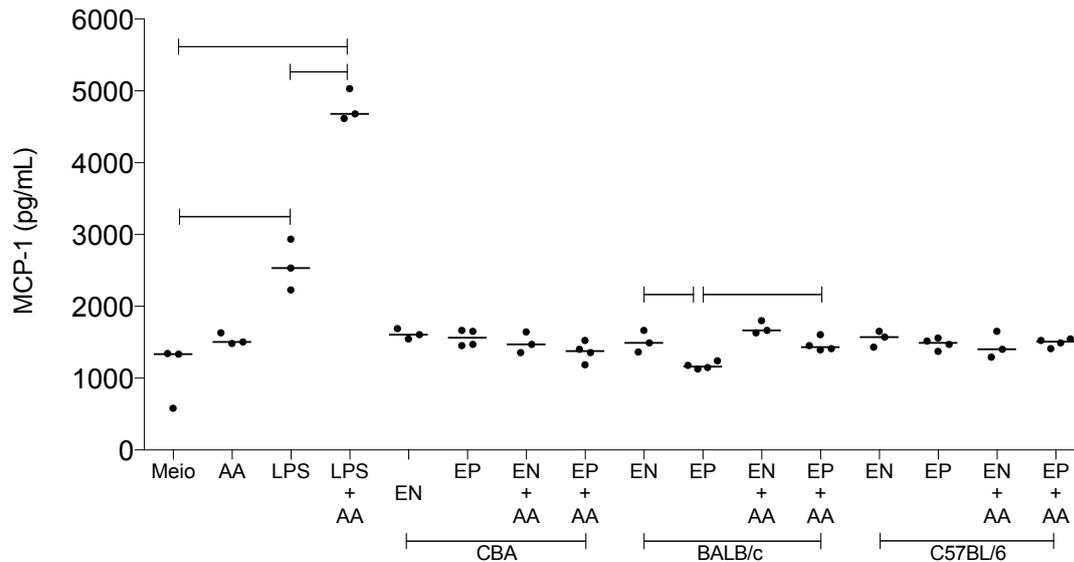


Figura 30: Influência do ácido anacárdico na produção de MCP-1 pelas células J774 estimuladas com eritrócitos parasitados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA de animais CBA, BALB/c e C57BL/6. Eritrócitos, parasitados e tratados com AA produziram mais IL-6 em relação aos não tratados (EP + AA > EP;  $p = 0,0018$ , Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação múltipla).

**Influência do ácido anacárdico sobre a produção de interleucina-6 (IL-6) pelas células J774 estimuladas in vitro com eritrócitos parasitados ou não de camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) a malária cerebral.**

Observamos que o tratamento com 50 $\mu$ M de AA não influenciou a produção basal de interleucina-6, porém as quando as células estimuladas com LPS e tratadas com AA (96,94) houve um aumento de 6 vezes na produção de IL-6 em relação a produção basal AA (16,27) ( $p = 0,0086$ ; Kruskal-Wallis, seguidas pelo método de Dunn para comparação múltipla) (Figura 31).

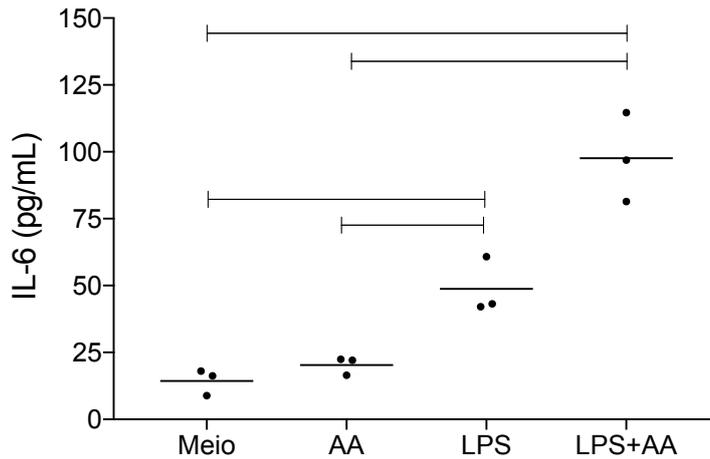


Figura 31: Influência do ácido anacárdico na produção de IL-6 pelas células J774 *in vitro*. O AA juntamente com o LPS aumentou a produção de IL-6 pelas células em relação as apenas estimuladas com AA (LPS + AA > AA;  $p = 0,0001$ , ANOVA, seguido pelo método de Student-Newmann-Keuls para comparação múltipla).

Os eritrócitos parasitados e não parasitados obtidos no sexto dia da infecção dos camundongos BALB/c também estimularam a produção da IL-6 pelas células J744 em relação à produção basal (meio) ( $p > 0,05$ ) ( $p = 0,0004$ , Kruskal-Wallis, seguidas pelo método de Dunn para comparação múltipla).

O acréscimo de AA aos poços com eritrócitos parasitados obtidos dos camundongos BALB/c aumentou significativamente a produção da IL-6 ( $p=0,04$ ; teste t)

Os eritrócitos parasitados obtidos dos camundongos CBA estimularam mais a produção da IL-6 do que os eritrócitos parasitados obtidos dos camundongos BALB/c ( $p > 0,05$ ) ( $p = 0,0004$ , Kruskal-Wallis, seguidas pelo método de Dunn para comparação múltipla) (Figura 32).

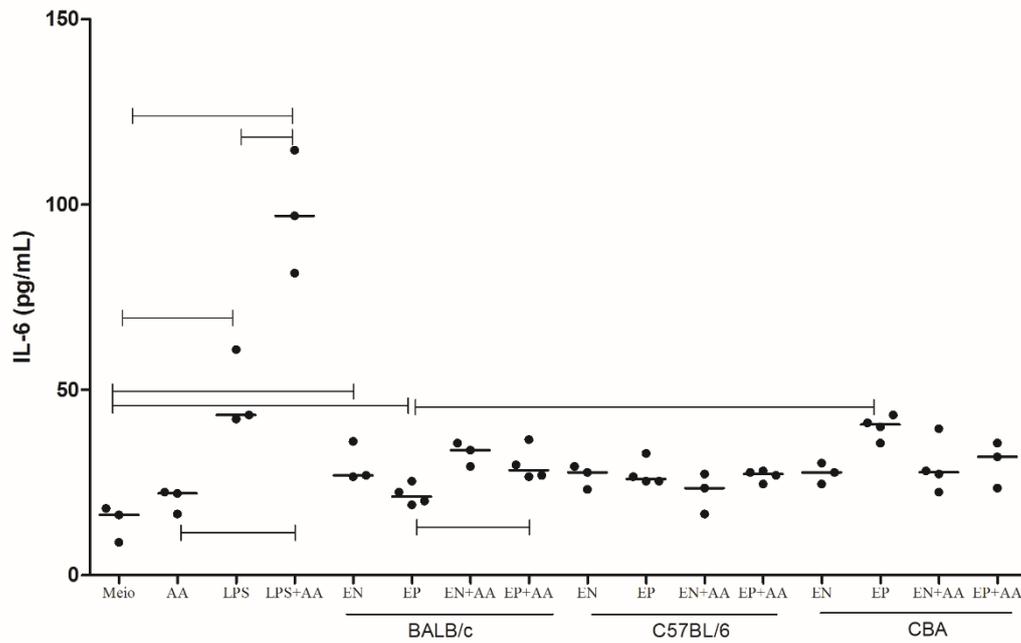


Figura 32: Influência do ácido anacárdico na produção de IL-6 pelas células J774. LPS > meio; LPS + AA > LPS; EP CBA > EP Balb; EP BALB + AA > EP BALB; EP + AA CBA < EP BAL (p=0,0004, Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação múltipla).

**Influência do ácido anacárdico sobre a produção de interleucina -10 (IL-10) pelas células J774 estimuladas *in vitro* com eritrócitos parasitados ou não de camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) a malária cerebral**

O AA aumentou a produção da IL-10 na ausência (AA > meio; p = 0,02; teste t) ou e presença de estímulo com o LPS (AA+LPS > AA; p = 0,012; Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação múltipla) (Figura 33).

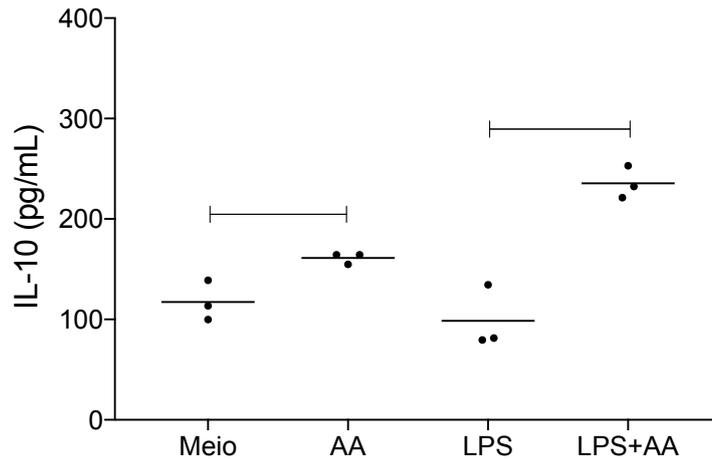


Figura 33: Influência do ácido anacárdico na produção de IL-10 pelas células J774 *in vitro*. O AA aumentou a produção da IL-10 na ausência e na presença do LPS ( $p = 0,0012$ , Kruskal-Wallis).

Os eritrócitos parasitados obtidos dos camundongos CBA estimularam mais a produção da IL-10 do que os EP dos camundongos BALB/c (EP Balb > EP CBA;  $p = 0,0286$ ; Mann-Whitney)

O acréscimo do AA ao sistema contendo EP de camundongos BALB/c aumentou a produção da IL-10 ( $p = 0,0286$ , Mann-Whitney), entretanto, resultado oposto foi verificado para os EP obtidos dos camundongos CBA, que diminuiriam significativamente a produção da IL-10 ( $p = 0,0294$ ; Mann-Whitney) (Figura 34).

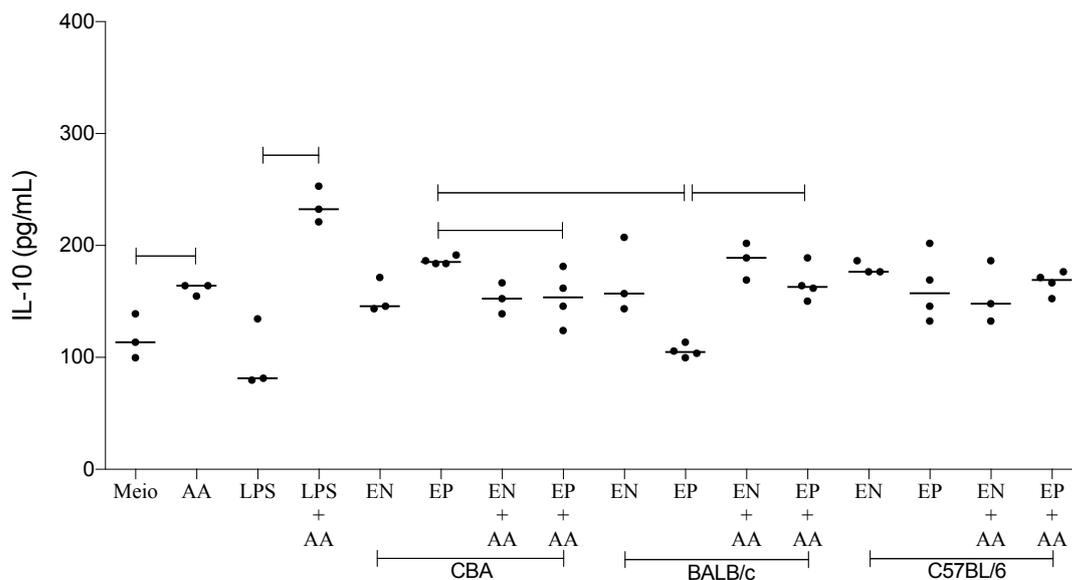


Figura 34: Influência do ácido anacárdico na produção de IL-10 pelas células J774 estimuladas com eritrócitos parasitados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA de camundongos BALB/c,

C57BL/6 e CBA. O AA aumento a produção da IL-10 na ausência e na presença do LPS ( $p = 0,0012$ , Kruskal-Wallis).  $EP < EP+AA$  para os camundongos BALB/c, porém  $EP > EP +AA$  para os camundongos CBA ( $p = 0,012$ , Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações).

## **Discussão**

Nosso trabalho mostrou pela primeira vez o efeito do ácido anacárdico na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em modelos experimentais susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou resistentes (BALB/c) à malária cerebral e utilizando linhagem celular de macrófagos J774.

Foi analisado o efeito do ácido anacárdico na sobrevivência dos animais susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) à malária cerebral nas doses de 150 e 100 em dose única diária e 50µM em dose única e em duas doses diárias de 25 µg/mL. Observamos que nas concentrações de 150µM e 100µM o ácido anacárdico aumentou a sobrevivência dos camundongos CBA. Entretanto, o ácido anacárdico não influenciou a sobrevivência dos animais das outras linhagens estudadas, nas doses que foram utilizadas nesse trabalho.

Uma possível explicação para o fato de que o ácido anacárdico tenha sido efetivo para diminuir a mortalidade nos camundongos CBA, mas não nas outras linhagens estudadas (C57BL/6 e BALB/c) pode estar relacionada ao fato de que os mecanismos fisiopatogênicos determinantes das formas graves na malária e particularmente da forma cerebral são diferentes nesses modelos experimentais estudados. O ácido anacárdico, que é um inibidor da histona acetiltransferase, inibe a expressão de genes da inflamação regulados pelo NFκB, como o fator de necrose tumoral (Sung e cols, 2008). Borges (2013) mostrou na infecção pelo *P. berghei* Anka dos camundongos CBA, C57BL/6 e BALB/c, que foram os mesmos modelos por nós estudados, que ocorre ativação diferente das vias do NFκB nesses modelos, determinando gravidades diferentes da doença. Borges observou que nos camundongos CBA houve ativação preponderantemente da via não-canônica do NFκB, com translocação predominante do relB para o núcleo somente nesse modelo. Assim uma possível explicação para a ação do ácido anacárdico apenas nesse modelo seria a influência desse ácido apenas na via do NFκB utilizada pelos camundongos CBA.

Outros trabalhos mostraram que drogas que modulam o fator de necrose tumoral podem aumentar a sobrevivência de camundongos CBA. Houve aumento da sobrevivência pelo tratamento com a talidomida, um imunomodulador que atua inibindo a via do NF-κB diminuindo níveis de TNF, IL-12, de camundongos CBA infectados pelo *P. berghei* ANKA (Muniz-Junqueira e cols 2005). A pentoxifilina,

é um inibidor da fosfodiesterase e resulta na regulação da via do NF- $\kappa$ B, também já foi testada como terapia imunomoduladora em modelos animais susceptíveis (CBA) e não susceptíveis (BALB/c) a malária cerebral e foi capaz de aumentar a sobrevivência dos camundongos CBA (Paula Júnior, 2003; Borges 2006) e BALB/c (Borges 2006), de acordo com esses trabalhos, observamos aumento da sobrevivência dos camundongos CBA pelo tratamento com o ácido anacárdico.

A análise do efeito do ácido anacárdico nas doses de 150, 100 e 50 mg/kg/dia sobre a evolução da parasitemia nos animais susceptíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral mostrou que nos camundongos C57BL/6 tratados com 150  $\mu$ M de ácido anacárdico houve redução da parasitemia somente no 6º dia de infecção, é possível que esse efeito mais tardio não tenha conseguido modificar a sobrevivência desses animais. Não houve modificação da parasitemia nas outras linhagens estudadas. Cui e cols (2008) mostraram efeito parasiticida do ácido anacárdico *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*. A menor parasitemia observada nos camundongos C57BL/6, sugere que o ácido anacárdico pode ter um efeito parasiticida também *in vivo*.

Observamos que no terceiro dia da infecção, nos camundongos CBA tratados com 50 mg/kg/dia, o hematócrito foi mais elevado quando comparado com os outros grupos de camundongos, mostrando que o início da anemia foi mais tardio nesse modelo. Entretanto, apenas no oitavo dia da infecção dos camundongos BALB/c, tratados com a mesma dose, o hematócrito estava mais elevado do que o dos animais tratados com 100 mg/kg/dia, sugerindo uma possível proteção da anemia de modo mais tardio pela droga. Isso sugere que os mecanismos que estão protegendo os animais da anemia pela ação do AA devem ser diferentes nesses dois modelos. Alam-Escamilla e cols. (2015) mostraram que o ácido anacárdico estimulou a maturação de eritrócitos policromáticos em camundongos BALB/c quando usado em baixa concentração. É possível que esse efeito estimulatório tenha ocorrido nos animais por nós estudados, porém o processo de maturação mostrou uma cinética diferente nos camundongos CBA e BALB/c.

Os camundongos BALB/c tratados com 150 mg/kg/dia perderam menos peso nos 7º, 8º e 9º dia comparado ao grupo controle não tratado. Os animais CBA tratados com 150 mg/kg/dia mostraram menos perda de peso no 6º dia de infecção comparado aos animais controles. Para os camundongos C57BL/6, não

houve diferença no peso em nenhum dos dias avaliados. Tem sido mostrado que o PPAR- $\gamma$  regula o metabolismo lipídico (Nagy e cols 1998), e o fato de o ácido anacárdico ser um agonista do PPAR- $\gamma$ , sugere que o AA possa também controlar o metabolismo lipídico diminuindo a perda progressiva de peso dos animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com AA. De fato, quando analisamos nos macrófagos J774 a expressão de corpúsculos lipídicos, que é um dos locais de controle do metabolismo lipídico nas células, verificamos um aumento desses corpúsculos pelo AA. Esse é um interessante aspecto da ação do AA, entretanto, precisa maiores esclarecimentos em relação a quais os mecanismos intracelulares que estão influenciados para determinar esse efeito.

Este trabalho mostrou pela primeira vez que o AA aumenta a expressão de corpúsculos lipídicos nas células J744. Observamos que eritrócitos normais e parasitados também aumentam a produção basal de corpúsculos lipídicos. Borges e cols. (2017) mostraram o mesmo fenômeno em macrófagos de camundongos. Observaram aumento da expressão de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA em relação aos macrófagos de camundongos não infectados. Uma possível explicação para a ativação dos corpúsculos lipídicos pelos eritrócitos parasitados seria a presença de grupos heme no meio de cultura pela ruptura de eritrócitos parasitados, pois os corpúsculos lipídicos têm função de desintoxicação do grupamento heme (Jackson e cols. 2004).

Tem sido observado que há relação entre a via no PPAR- $\gamma$  e a produção de corpúsculos lipídicos, sendo que o PPAR- $\gamma$  controla o metabolismo lipídico das células (Nagy e cols 1998), como também estão envolvidos na modulação de processos inflamatórios (Pacheco e cols 2002). O AA é um agonista de PPAR- $\gamma$ , atividade semelhante à da rosiglitazona. McDonough e cols. (2009) mostraram que a rosiglitazona desencadeou a produção de corpúsculos lipídicos em adipócitos, da mesma forma que outros agonistas utilizados nesse estudo como Zen-Bio. Provavelmente, a atividade agonista do PPAR- $\gamma$  do AA teve um papel ao aumentar a produção e corpúsculos lipídicos nas células J774.

Nossos estudos também mostraram que o AA diminuiu a expressão dos corpúsculos lipídicos nas células J774 estimuladas com eritrócitos parasitados. Provavelmente, esse efeito foi determinado pelo somatório das atividades

antioxidante (Trevisan 2006), anti-inflamatória (Carvalho 2011) e parasiticida (Cui e cols 2008) do ácido anacárdico.

Quando foi associado LPS ao sistema que continha o AA na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , observamos aumento significativo da expressão dos corpúsculos lipídicos pelas células J774. Entretanto, diferentemente, AA associado ao LPS em outros sistemas produziu resultados opostos. Yasutake e cols. (2013) mostraram que o ácido anacárdico na concentração de 100 $\mu\text{M}$  inibiu a produção de IL-8 induzida por LPS. E Gutiérrez (2011) também mostrou que o AA inibiu a produção do NO induzido pelo LPS, entretanto, a concentração utilizada do AA foi de 100  $\mu\text{M}$ . Como em nosso estudo utilizamos a concentração de 50  $\mu\text{M}$  e observamos diminuição significativa na produção do NO, é possível que a resposta ao AA seja concentração dependente. Nossos achados são semelhantes aos observados por Gutiérrez (2011), que avaliou a produção de óxido nítrico por células J774A1 estimuladas com ácido anacárdico em 5 concentrações e estimuladas com LPS, INF- $\gamma$ , e N $\omega$ -nitro-arginina metil éster, um inibidor da produção de óxido nítrico.

Observamos que o tratamento dos macrófagos J744 com AA na presença de eritrócitos não parasitados, inibiu a produção de óxido nítrico. Sendo que essa inibição não ocorreu quando as células foram estimuladas com eritrócitos parasitados, sugerindo que a presença do parasito no sistema influenciou a resposta das células ao AA.

Nosso trabalho mostrou pela primeira vez o efeito do ácido anacárdico na produção das citocinas FNT, MCP-1, IL-6 e IL-10 pelas células J774 tratadas com AA e estimuladas com LPS e eritrócitos parasitados ou não parasitados de camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou resistentes (BALB/c) à malária cerebral. Em relação a produção de FNT, o ácido anacárdico não modificou a produção do FNT isoladamente, e quando associado ao LPS, não modificou o aumento da produção causada pelo LPS. Nossos resultados são diferentes dos de Xagorari e cols (2002), que avaliou a atividade de flavonóides luteolina em células RAW 264.7, que são macrófagos murinos, e observou que o composto isoladamente não modificou a produção de FNT em relação ao nível basal, porém o composto associado com LPS induziu o aumento da produção de FNT consideravelmente, e concluíram que a luteolina poderia bloquear a atividade da via P13-K, porém não contribuiu para inibir a produção de FNT pelo LPS,

sugerindo que existem múltiplos alvos celulares para desencadear a produção de FNT e o fato de a luteolina bloquear uma das vias de produção, não impede o estímulo por outras vias inflamatórias. É provável que o mesmo fenômeno ocorreu quando colocamos o ácido anacárdico associado com o LPS para avaliar a produção de FNT. Entretanto, a presença de eritrócitos parasitados não modificou a produção do FNT pelas células J774. Nossos resultados foram semelhantes aos de Borges (2006) que estudou o efeito da pentoxifilina, e Tabanez (2006) que avaliou o efeito da talidomida, que não observaram alteração na produção de FNT por macrófagos peritoneais pelo tratamento com essas drogas moduladoras da resposta inflamatória.

Nossos dados mostraram que o AA não modificou a produção da quimiocina MCP-1 pelos macrófagos J774 isoladamente, entretanto, quando foi associada com o LPS, houve um aumento significativo da produção da MCP-1. Qin e cols. 2016 avaliaram a influência do micheliolídio sobre a produção de MCP-1 em células THP-1, e observaram que o composto, nas concentrações testadas, junto com o LPS aumentou a produção de MCP-1 em relação ao estímulo apenas com o LPS, semelhante às nossas observações com as células J774. O fato de o AA ter aumentado a produção da quimiocina quando eritrócitos parasitados de camundongos BALB/c foram acrescentados ao sistema pode ter contribuído para maior eficácia dos monócitos na defesa antiparasitária, pelo efeito quimiotático do MCP-1 sobre os monócitos, o que poderia contribuir para facilitar o encontro dos eritrócitos infectados com o fagócito. Resultado semelhante foi observado quando analisamos a produção da IL-6, em que o ácido anacárdico isoladamente não modificou a produção da IL-6, entretanto, aumentou significativamente a produção da IL-6 quando foi associado ao sistema o LPS (AA+LPS). De modo semelhante também quando associado a eritrócitos parasitados obtidos de camundongos BALB/c infectados com o *Plasmodium berghei* Anka, houve aumento da produção da IL-6. Sendo a IL-6 responsável pela resposta inflamatória inicial, é possível que o AA possa contribuir para diminuir a gravidade da doença nesse modelo, por facilitar a indução da resposta inflamatória inicial. Nossas observações são semelhantes às de Xie e cols (2011; 2012) que avaliaram a produção de IL-6 por células raw 264.7 estimuladas com LPS e soro de animais alimentados com mirtilo e compostos flavonoides do açaí, respectivamente. Houve aumento da produção da IL-6 quando as células foram

tratadas com soro dos animais que utilizaram o mirtilo e os flavonóides e foram estimuladas com LPS. Nesses dois estudos foi mostrado que esses compostos conseguiram inibir a via do NF- $\kappa$ B. É provável que o ácido anacárdico tenha apenas inibição parcial das múltiplas vias de ativação do NF $\kappa$ B (Sung e cols 2008), podendo também apresentar atividade diferente em outras vias inflamatórias.

Interessantemente, nossos dados mostraram que o AA isoladamente aumentou a produção da IL-10 pelas células J774, como também aumentou a produção dessa citocina moduladora da resposta imunitária quando na presença de eritrócitos parasitados obtidos de camundongos BALB/c e CBA. Nossos estudos são semelhantes aos achados de Ferlazzo e cols (2003) que avaliaram a produção de IL-10 estimulada pelo LPS e annexina-1 em células J774. A annexina-1 aumentou de forma significativa a produção de IL-10 quando associada ao LPS. Assim como para a annexina-1, esses dados sugerem que o ácido anacárdico tenha atividade anti-inflamatória e imunorreguladora pela modulação da expressão da IL-10. O fato de que a IL-10 poder modular a resposta do sistema imunitário, sugere que esse efeito do AA possa contribuir para ocasionar uma resposta mais equilibrada na infecção dos modelos BALB/c e CBA. De fato, Borges e cols (2017) mostraram que esses dois modelos apresentam respostas do sistema imunitário mais equilibrada do que os camundongos C57BL/6, que mostra a forma mais grave da malária experimental.

Contudo sugerimos que sejam feitos mais estudos para maiores esclarecimentos da ação do ácido anacárdico na malária.

Como limitações de nosso trabalho podemos apontar o pequeno número de animais que foram utilizados em alguns testes. Para que pudéssemos tirar conclusões mais robustas seria importante avaliar doses maiores do ácido anacárdico, como também uniformizar o número de animais em cada grupo utilizado. A utilização de células de linhagem tumoral, como as células J774, são de grande valia pois serve para direcionar para futuros estudos, porém apresenta limitações em seu uso por não reproduzem fielmente o que ocorre em um organismo completo, pois sua atividade metabólica pode ser diferente das células normais do organismo, e além disso, o uso de células de linhagem exclui a interferência das respostas do próprio organismo, o que pode não representar

fidedignamente a resposta do indivíduo para as avaliações realizadas, assim não sendo possível avaliar rigorosamente o desfecho da avaliação experimental.

Em conclusão, nosso estudo mostrou que o ácido anacárdico apresentou efeitos diferentes nas linhagens de camundongos susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou não (BALB/c) a malária cerebral, aumentando a sobrevida apenas dos camundongos BALB/c. Como o PPAR- $\gamma$  se expressa diferentemente nos diferentes modelos experimentais de malária em camundongos (Borges 2013), nossos dados sugerem que os diferentes efeitos do ácido anacárdico observados nesse trabalho tenham ocorrido pelo fato de cada modelo utilizar via diferente do PPAR- $\gamma$ , que atua diferentemente nas diversas vias do NF $\kappa$ B. Uma possível explicação para o fato de que o ácido anacárdico tenha sido efetivo para diminuir a mortalidade nos camundongos CBA, mas não nas outras linhagens estudadas (C57BL/6 e BALB/c) pode estar relacionada às doses utilizadas nesse trabalho, como também ao fato de que os mecanismos fisiopatogênicos determinantes das formas graves na malária e particularmente da forma cerebral são diferentes nesses três modelos experimentais estudados. Sendo possível que o ácido anacárdico tenha efeito diferente nas vias canônica e não canônica do NF $\kappa$ B, que é são utilizadas diferentemente pelos três modelos de camundongos estudados (Borges, cols, 2013).

## **Conclusões**

1. Houve aumento da sobrevivência dos camundongos CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA em 1 dia quando tratados com 150 mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia de ácido anacárdico. Entretanto, o ácido anacárdico não influenciou a sobrevivência dos camundongos C57BL/6 e BALB/c.
2. Houve menor comprometimento do hematócrito dos camundongos CBA tratados com 50 mg/kg/dia no 3º dia de infecção quando comparado ao grupo controle e às demais concentrações testadas. No 8º dia de infecção o hematócrito dos camundongos BALB/c tratados com 50 mg/kg/dia estava menos comprometido quando comparado com o grupo tratado com 100 mg/kg/dia.
3. O ácido anacárdico proporcionou uma menor perda de peso dos animais CBA tratados com 150 mg/kg/dia comparados ao grupo controle no 6º dia de infecção. Os animais BALB/c tratados com 150 mg/kg/dia de ácido anacárdico perderam menos peso nos dias 7, 8 e 9 comparado com os outros grupos.
4. A dose de 150 mg/kg/dia de AA melhorou a parasitemia dos animais C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.
5. O AA anacárdico não foi tóxico para as células J774 nas concentrações de 100 µM – 0,78 µM, pois não modificou o metabolismo mitocondrial das células J774.
6. O ácido anacárdico aumentou a expressão basal de corpúsculo lipídico nas células J774. Quando as células J774 foram incubadas com os eritrócitos parasitados e tratadas com ácido anacárdico houve diminuição da expressão dos corpúsculos lipídicos em relação às células com incubadas apenas com eritrócitos parasitados. As células tratadas com ácido anacárdico e estimuladas com LPS e eritrócitos parasitados tiveram maior expressão de corpúsculos lipídicos em

comparação as células tratadas com ácido anacárdico e estimuladas com eritrócitos parasitados.

7. O AA na concentração de 50  $\mu$ M associado ao LPS aumentou a produção de NO nas células J774 em comparação ao uso isolado de ácido anacárdico, porém não aumentou em relação à produção de NO estimulada isoladamente pelo LPS. O AA manteve os níveis de NO nos eritrócitos parasitados, o mesmo não ocorreu nos eritrócitos não parasitados, mostrando atividade imunomoduladora do AA.
8. Na concentração de 50  $\mu$ M de AA associado ao LPS houve aumento da produção de FNT pelos macrófagos J774. Nas células estimuladas com eritrócitos parasitados e não parasitados o AA não modificou a produção de FNT.
9. O ácido anacárdico não modificou a produção basal de MCP-1 pelas células J774. As células estimuladas com eritrócitos parasitados e LPS e tratadas com AA mostraram maior produção de MCP-1 comparada com as células estimuladas apenas com LPS ou apenas tratadas com AA. As células estimuladas com eritrócitos não parasitados mostrou maior produção de MCP-1 em relação as células com eritrócitos parasitados. A produção de MP-1 foi maior nas células estimuladas com eritrócitos parasitados tratados com AA em relação as células com apenas eritrócitos parasitados.
10. O ácido anacárdico aumentou a produção de IL-10 pelos macrófagos J774 em relação a produção basal. As células estimuladas com LPS e tratadas com AA mostraram maior produção de IL-10 em relação as células apenas com LPS. Nas células estimuladas com eritrócitos de camundongos BALB/c, parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratadas com ácido anacárdico, a produção de IL-10 foi maior em relação as células estimuladas apenas com eritrócitos parasitados. O efeito contrário foi observado nos macrófagos estimulados com eritrócitos de CBA infectados com *P. berghei* ANKA.

11. O ácido anacárdico não influenciou a produção basal de IL-6 pelos macrófagos J774. Os macrófagos estimulados com LPS e tratados com AA produziram mais IL-6 em relação aos macrófagos estimulados apenas com LPS.

12. As células J774 estimuladas com LPS produziram mais IL-10 que as células apenas tratadas com AA. As células tratadas com AA e estimuladas com eritrócitos de camundongos BALB/c parasitados com *P. berghei* Anka produziram mais IL-10 quando analisada em relação aos macrófagos apenas estimulados com eritrócitos parasitados.

Em conclusão, nossos dados mostraram ações diferenciadas nos diferentes modelos da malária estudados. Uma possível explicação para os diferentes efeitos observados do ácido anacárdico nos animais susceptíveis (CBA e C57BL/6) ou não susceptíveis (BALB/c) a malária cerebral seria que os resultados observados tenham sido determinados pelo fato do PPAR- $\gamma$  modular a via do NF- $\kappa$ B que se expressa de forma diferente nos modelos experimentais estudados.

## **Referências Bibliográficas**

Aguiar ACC, Rocha EMM, de Souza NB, França TCC, Krettli AU. New approaches in antimalarial drug discovery and development – A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012; 107: 831-845.

Archana, Jatawa S, Paul R, Tiwari A. Indian Medicinal Plants: A Rich Source of Natural Immuno-Modulator. Int J Pharmacol 2011; 7: 198-205.

Baeuerle PA, Baltimore D. Ten years after. Cell 1996; 87: 13-20,

Baldwin ASJ. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol 1996; 14: 649-83.

Becker HF, Jerrentrup A, Ploch T, Grote L, Penzel T, Sullivan CE, Peter JH. Effect of nasal continuous positive airway pressure treatment on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. Circulation 2003; 107: 68-73.

Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H, Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. Int J Parasitol 2004; 34: 163-189.

Boop SE, Ramachandran V, Herson K, Luzander A, Lindstorm M, Spooner M, Steffy BM, Suzuki O, Janse C, Waters AP, Zhou Y, Wiltshire T, Winzeler EA. Genome wide analysis of inbred mouse lines identifies a locus containing PPAR-gamma as contributing to enhanced malaria survival. PLoS One 2010; 5: e10903.

Borges TKS. Influência da pentoxifilina na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos susceptíveis e resistentes à malária cerebral Dissertação de Mestrado. Patologia Molecular. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

Borges TKS. Mecanismos de resposta inflamatória em modelos murinos susceptíveis ou não a malária cerebral, infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Tese de Doutorado. Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

Borges TKS, Alves EAR, Vasconcelos HAR, Carneiro FP, Nicola AM, Magalhães KG, Muniz-Junqueira MI, Differences in the modulation of reactive species, lipid bodies, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and PPAR- $\gamma$  in cerebral malaria-susceptible and resistant mice. *Immunobiology* 2017; 222: 604-619.

Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791: 540-551.

Bozza PT, D'Avila H, Almeida PE, Magalhães K, Almeida C, Molinaro R, Almeida CJ. Lipid droplets in host-pathogen interactions. *Clin Lipidol* 2009, 4: 791-807.

Brasier AR. The NF- $\kappa$ B Regulatory Network. *Cardiovasc Toxicol* 2006; 06: 111-130.

Carvalho LJ, Lenzi HL, Pelajo-Machado M, Oliveira DN, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. *Plasmodium berghei*: cerebral malaria in CBA mice is not clearly related to plasma TNF levels or intensity of histopathological changes. *Exp Parasitol* 2000; 95: 1-7.

Castillo-Juarez I, Rivero-Cruz F, Celis H, Romero I. Anti- *Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol* 2007; 114: 72-77.

Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 2002; 115: 3049-3059.

Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Pineda-Torral, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer BH, Fruchart JC, Clavey V, Staels S. PPAR- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  activators induce cholesterol removal from human macrophage from cells through stimulator of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001; 7: 53-58.

Couper NK, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to

infection. *J Immunol* 2008; 180: 5771-7.

Cui L, Miao J, Furuya T, Fan Q, Li X, Rathod PK, Su XZ, Cui L. Histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid causes changes in global gene expression during *in vitro Plasmodium falciparum* development. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 1200–1210.

D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, Melo RC, Dosreis GA, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. *J Infect Dis* 2011; 204: 951-961.

Deroost K, Pham TT, Opdenakker G, Van den Steen PE. The immunological balance between host and parasite in malaria. *FEMS Microbiol Rev* 2016; 40: 208–257.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Brasil Patol Med Lab* 2003; 4: 343-350.

Elias RM, Correa-Costa M, Barreto CR, Silva RC, Hayashida CY, Castoldi A, Goncalves GM, Braga TT, Barboza R, Rios FJ, Keller AC, Cenedeze MA, Hyane MI, D'Imperio-Lima MR, Figueiredo-Neto AM, Reis MA, Marinho CR, Pacheco-Silva A, Camara NO. Oxidative stress and modification of renal vascular permeability are associated with acute kidney injury during *P. berghei* ANKA infection. *PLoS One* 2012; 7: e44004.

Engwerda CR, Mynott TL, Sawhney S. Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med* 2002; 195: 1371–7.

Evans KJ, Hansen DS, van Rooijen N, Buckingham LA, Schofield L. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* 2006; 107: 1192-9.

Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari E, Parente L. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 1363-9.

Finney CA, Lu Z, Hawkes M, Yeh WC, Liles WC, Kain KC. Divergent roles of IRAK4-mediated innate immune responses in two experimental models of severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 83: 69-74.

França TCC, Santos MGS, Figueroa-Villar JD. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quím Nova* 2008; 31; 5: 1271-1278.

Francischetti IMB, Gordon E, Bizzarro B, Gera N, Andrade BB, Oliveira F, Ma D, Assumpção TCF, Ribeiro JMC, Pena M, Qi C, Diouf A, Moretz SE, Long CA, Ackerman HC, Pierce SK, Nunes AS, Waisberg M. Tempol, an intracellular antioxidant inhibits tissue factor expression, attenuates dendritic cell function, and is partially protective in a murine model of cerebral malaria. *Plos One* 2014; 9: e87140.

Germano N, Mendonça RP, Murinello A. Adequação dos fármacos antimaláricos na quimioprofilaxia e tratamento da malária em países não endêmicos. *Medicina Interna* 2005; 12: 165- 170.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- $\kappa$ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-60.

Gomes MAM, Neto NCM, Bispo IGA. Interleucina-6, moléculas de adesão intercelular-1 e microalbuminúria na avaliação da lesão endotelial: revisão de literatura. *Rev SOCERJ* 2009; 22: 398–403.

Grau GE, Frei K, Piguet PF, Fontana A, Heremans H, Billiau A, Vassalli P, Lambert PH. Interleukin 6 Production in Experimental Cerebral Malaria: Modulation by Anticytokine antibodies and possible role in hypergammaglobulinemia. *J Exp Med* 1990; 172: 1505-1508

Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 744 - 757.

Green LC, De Luzuriaga KR, Wagner DA, Rant W, Istfan N, Young VR. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7764-7768.

Gutiérrez LJV. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de subproductos del fruto falso de marañón (*Anacardium occidentale* L) variedad roja. Tese. Universidad Veracruzana, Veracruz. 2011.

Halliwell B, Gutteridge JMC, *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Clarendon, Ed. Kelvin DJA; ed Oxford, Washington 2007; 288.

Hogquist KA, Netr MA, Emil R, Unanuet ER, Chaplin DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 8485-8489.

Hu X, Tao C, Gan Q, Zheng J, Li H, You C. Oxidative stress in intracerebral hemorrhage: Sources, mechanisms, and therapeutic targets oxidative medicine and cellular longevity. *Oxid Med Cell Longev* 2016; Article ID 3215391, 1-12.

Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJP, Adisa A, Dogovski C, Tilley L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2004; 54: 109–122.

Jin Q, Yu L, Wang Z, Zhang L, Kasper J, Lee C, Wang P, Brindle S, Dent KG, Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/ 27ac in nuclear receptor transactivation: histone acetylation and gene activation. *EMBO J* 2011; 30: 249–262.

Karin M, Cao Y, Greten GR, Li ZW. NF-Kb in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 301-310.

Kubo I, Ha TJ, Tsujimoto K, Tocoli FE, Green IR. Evaluation of lipoxygenase inhibitory activity of anacardic acids. *Z Naturforsch C* 2008; 63: 539-546.

Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, Tsujimoto K. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chem* 2006; 99: 555-562.

Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ -dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4699-4707.

Li YJ, Yang Q, Weng XG, Yang L, Wang YJ, Chen Y, Zhang D, Li Q, Liu XC, Kan, XX, Chen X, Zhu XX, Kmoníèková E, Zídek Z. Flavonoids Casticin and chrysosplenol D from *Artemisia annua* L. inhibit Inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol Appl Phamacol* 2015; 286: 151-8.

Lima JCB. Análise da interação entre moléculas desenhadas a partir do ácido anacárdico e a proteína PPAR usando ferramentas *in silico*. Dissertação de Mestrado, Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 2016.

Lodovici M, Guglielmi F, Meoni M, Dolara P. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 1205-1210.

Luisi SB, Barbachan JJD, Chies JAB, Filho MS. A cultura de células como ferramenta para estudos do comportamento pulpar. *Rev Fac Odontol* 2004; 45: 3-8.

Lyke K, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), 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. *Infect Immun* 2004; 72: 5630–7.

Masuoka N, Kubo I. Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acid. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1688: 245-249.

Mendes M, La Pointe MC. PPAR $\gamma$  inhibition of cyclooxygenase-2 PGE<sub>2</sub> synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension* 2003; 42: 844-850.

Miller LH, Baruch DI, Marsik K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; 415: 673-679.

Morais TC, Pinto NB, Carvalho KMMB, Rios JB, Ricardo NMPS, Trevisan MTS, Rao VS, Santos FA. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. *Chem Biol Interact* 2010; 183: 264-269.

Mshana RN, Boulandi J, Mshana NM, Mayombo J, Mendome G: Cytokines in the pathogenesis of malaria: levels of IL-1 beta, IL-4, IL-6, TNF alpha and IFN-gamma in plasma of healthy individuals and malaria patients in a holoendemic area. *J Clin Lab Immunol* 1991; 34: 131–139.

Muniz-Junqueira MI, Silva FO, de Paula-Júnior MR, Tosta CE. Thalidomide influences the function of macrophages and increases the survival of *Plasmodium berghei*-infected CBA mice. *Acta Trop.* 2005; 94: 128-138.

Muniz-Junqueira MI, Tosta CE. The pathological bases of immunomodulatory therapy in malaria. *Antibiotiques.* 2007; 9: 164-172.

Muniz-Junqueira, M.I. Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. *Cur Clin Pharmacol* 2007; 1: 59-73.

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR-gamma. *Cell* 1998; 93: 229–240.

Niikura, M, Inoue, SI, Kobayashi, F. Role of Interleukin-10 in Malaria: Focusing

on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. J Biomed Biotechnol 2011, Article ID 383962, 1-8.

Nitcheu J, Bonduelle O, Combadiere C. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. J Immunol 2003; 170: 2221–2228.

Nussler A, Drapier JC, Renia L, Pied S, Miltgen F, Gentilini M, Mazier D. L-Arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin-6 stimulation. Eur J Immunol 1991; 21: 227-230.

OMS, Organização Mundial da Saúde. World Malaria Report 2015.

Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. J Immunol 2002; 169: 6498–6506.

Percario S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves AM, Laurindo PSOC, Vilhena TC, Dolabela MF, Green MD. Oxidative stress in malaria. Int J Mol Sci 2012; 13: 16346–16372

Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. J Immunol Meth 1980; 38: 161-170.

Pinna RA. Influência Das Coinfecções Por *Plasmodium Yoelii* 17XNL E *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania amazonensis* No Curso Das Infecções E Na Resposta Imune De Camundongos BALB/c. Tese de Doutorado. Biologia Parasitária. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro 2016.

Plebanski M, Hill AV. The immunology of malaria infection. Cur Opin Immunol 2000; 12: 437-441.

Qin X, Jiang X, Jiang X, Wang Y, Miao Z, He W, Yang G, Lv Z, Yu Y, Zheng Y. Micheliolide inhibits LPS-induced inflammatory response and protects mice from LPS challenge. *Sci Rep* 2016; 6: 1-13.

Queiroz NL, Rodrigues DH, Vilela MC, Miranda AS, Amaral DCG, Camargos ERS, Carvalho LJM, Howe CL, Teixeira MM, Teixeira AL. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA) infected mice. *Exp Parasitol* 2010; 125: 271–278.

Raza A, Khan MS, Ghanchi NK, Raheem A, Beg M. Tumour necrosis factor, interleukin-6 and interleukin-10 are possibly involved in *Plasmodium vivax*-associated thrombocytopenia in southern Pakistan population. *Malar J* 2014; 13: 323-329.

Rodrigues-Duarte L, de Moraes LV, Barboza R, Marinho CR, Franke-Fayard B, Janse CJ, Penha-Goncalves C. Distinct placental malaria pathology caused by different *Plasmodium berghei* lines that fail to induce cerebral malaria in the C57BL/6 mouse. *Malar J* 2012; 11: 231-239

Rodríguez NE, Lockard RD, Turcotte EA, Araujo-Santos T, Bozza PT, Borges VM, Wilson ME. Lipid bodies accumulation in *Leishmania infantum*-infected C57BL/6 macrophages. *Parasite Immunol* 2017; 3-5.

Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002; 415: 680-685.

Sarr D, Cooper CA, Bracken TC, Martinez-Uribe O, Nagy T, Moore JM. Oxidative Stress: A Potential Therapeutic Target in Placental Malaria. *Rev Immuno Horizons* 2017; 1: 29-41.

Shehata MF. Rel/Nuclear factor-kappa B apoptosis pathways in human cervical cancer cells. *Cancer Cell Internat* 2005; 5: 1-13.

Siebenlist, U. NF-Kb proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1332: 7-13.

Sinniah R, Rui-Mei L, Kara A. Up-regulation of cytokines in glomerulonephritis associated with murine malaria infection. *Int J Exp Pathol* 1999; 80: 87-95.

Stevens RG, Nerishi K. Iron and oxidative damage in human cancer. In: *Biological Consequences of Oxidative Stress: Implications for Cardiovascular Disease and Carcinogenesis*. New York: Oxford University Press 1992; 138-161.

Sung B, Pandey MK, Anh KS, Yi T, Chaturvedi MM, Liu M, Aggarwal BB. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid) an inhibitor of histone acetyltransferase, suppress expression of nuclear factor-kappa B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion and inflammation through inhibition of inhibitory subunit of nuclear factor-kappa B alpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* 2008; 111: 4880-4891.

SVS, Secretária de Vigilância em Saúde. *Boletim Epidemiológico* 2014; Vol. 44 Nº1.

Tan RS, Kara AU, Feng C, Asano Y, Sinniah R. Differential interleukin-10 expression in interferon regulatory factor-1 deficient mice during *Plasmodium berghei* blood-stage infection. *Parasite Immunol* 2000; 22: 425-435.

Trevisan MTS, Spiegelhalder B, Bartsch H, Owen R, Wüetele G, Pfundstein B, Haubner R. Characterization of alkyl phenols in Cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44: 188-197.

Utter C, Serrano AE, Glod JW, Leibowitz MJ. Association of *Plasmodium falciparum* with Human Endothelial Cells in vitro *Yale J Biol Med*. 2017; 90: 183–193.

Van den Steen PE, Deroost K, Van Aelst I, Geurts N, Martens E, Struyf S, Nie

CQ, Hansen DS, Matthys P, Van Damme J, Opdenakker G. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. *Eur J Immunol* 2008; 38: 1082-1095.

Vitral JCA, Fraga MR, Souza MA, Ferreira AP, Vitral RWF. In-vitro study of cellular viability and nitric oxide production by J774 macrophages stimulated by interferon gamma with ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets. *Am J Orthod Dentof Orthop* 2010; 5: 665-70.

Vreden SG, van den Broek, MF, Oettinger MC, Verhave JP, Meuwissen JH, Sauerwein RW. Cytokines inhibit the development of liver schizonts of the malaria parasite *Plasmodium berghei in vivo*. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2271–2275.

Wassmer SC, Grau GER. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *Int J Parasitol* 2017; 47: 145–152.

Welch JS, Ricote M, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Glass CK. PPAR{gamma} and PPAR{delta} negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN- $\gamma$  target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6712-6717.

Wenisch C, Linnau KF, Looaresuwan S, Rumpold H. Plasma levels of the interleukin-6 cytokine family in persons with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 1999; 179: 747–750.

White NJ, Turner GD, Medana IM, Dondorp AM, Day NP. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol* 2010; 26: 11-15.

Wisastra R, Kok PA, Eleftheriadis N, Baumgartner MP, Camacho CJ, Haisma HJ, Dekker FJ. Discovery of a novel activator of 5-lipoxygenase from an anacardic acid derived compound collection. *Bioorg Med Chem*. 2013; 21: 7763–7778.

Xagorari A, Roussos C, Papapetropoulos A. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 1058 - 1064.

Xie C, Kang J, Ferguson ME, Nagarajan S, Badger TM, Wu X. Blueberries reduce pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and IL-6 production in mouse macrophages by inhibiting NF- $\kappa$ B activation and the MAPK pathway. *Mol Nut Food Res* 2011; 55: 1587–1591.

Xie C, Kang J, Li Z, Schauss AG, Badger TM, Nagarajan S, Wu T, Wu X. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- $\alpha$  and IL-6 production through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway. *J Nutr Biochem* 2012; 23:1184-91.

Yasutake T, Wada H, Higaki M, Nakamura M, Honda K, Watanabe M, Ishii H, Kamiya S, Takizawa H, Goto H. Anacardic acid, a histone acetyltransferase inhibitor, modulates LPS-induced IL-8 expression in a human alveolar epithelial cell line A549. *F1000Research* 2013; 2: 1-10.

Ye J. Regulation of PPAR gamma function by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 374: 405-408.

Yeo TW, Lampah DA, Kenangalem E. Decreased endothelial nitric oxide bioavailability, impaired microvascular function, and increased tissue oxygen consumption in children with falciparum malaria. *J Infect Dis* 2014; 210: 1627–32.

Yoshimoto T, Takahama Y, Wang CR, Yoneto T, Waki S, Nariuchi H. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. *J Immunol* 1998; 16: 5500-5505

Zhu J, Krishnegowd G, Gowda C. Induction of pro-inflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase

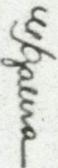
and NF-kappaB pathways for the expression of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide. *J Biol Chem* 2005; 280: 8617-8627.

Zuzarte-Luis V, Mota MM, Vigário AM. Malaria infections: What and how can mice teach us. *J Immunol Meth* 2014; 410: 113-122.

Brasília, 19 de outubro de 2016.

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ANACÁRDICO EM CAMUNDONGOS C57BL/6, CBA E BALB/C INFECTADOS COM PLASMODIUM BERGHEI ANKA.", UnBDoc n.º 66695/2016, sob responsabilidade da Professora Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (90 machos). A presente aprovação é válida pelo período de 19/07/2016 a 31/03/2017.



Prof.ª. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.