

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA
CURSO DE MEDICINA

LUIZ HENRIQUE ALVES MACIEL

ANÁLISE DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
Dysphania ambrosioides L. EM UM MODELO DE MALÁRIA CEREBRAL

IMPERATRIZ-MARANHÃO

2019

LUIZ HENRIQUE ALVES MACIEL

ANÁLISE DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
Dysphania ambrosioides L. EM UM MODELO DE MALÁRIA CEREBRAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Medicina da Universidade Federal
do Maranhão, Campus Imperatriz, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Bacharel em Medicina

Orientador: Prof Dr Aramys Silva dos Reis

IMPERATRIZ-MARANHÃO
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Alves Maciel, Luiz Henrique.

ANÁLISE DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DA *Dysphania ambrosioides* L. EM UM MODELO
DE MALÁRIA CEREBRAL / Luiz Henrique Alves Maciel. - 2019.
58 p.

Orientador(a): Aramys Silva dos Reis.

Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhão,
Imperatriz- Maranhão, 2019.

1. Absorção. 2. *Chenopodium ambrosioides*. 3.
Investigação Laboratorial. 4. Malária Cerebral. I. dos
Reis, Aramys Silva. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA
CURSO DE MEDICINA

Candidato: Luiz Henrique Alves Maciel

Título do TCC: Análise do potencial terapêutico do extrato hidroalcoólico da *Dysphania ambrosioides L.* em um modelo de malária cerebral

Orientador: Aramys Silva dos Reis

A Banca Julgadora de trabalho de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, em sessão pública realizada a 18 / 06 / 2019, considerou

Aprovado

Reprovado

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA

CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do potencial terapêutico da espécie vegetal *Chenopodium ambrosioides* no tratamento da malária cerebral**” registrada com o nº **23115.005011/2017-41**, sob a responsabilidade de **Aramys Silva dos Reis**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	01/01/2018 à 01/01/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos/Swiss
Nº de animais	88
Peso/Idade	25-30g/8-10 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFMA

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva
Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
UFMA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus não somente por proporcionar a conclusão desse trabalho, mas por fornecer em seu momento as oportunidades adequadas para uma formação de qualidade e gratuita.

A meu pai Carlos Roberto Maciel e minha mãe Cláudia Alves Maciel merecem mais que um agradecimento e sim o real reconhecimento dos seus esforços para que este momento tão sonhado se torne concreto em minha vida, são eles os responsáveis pelo título, o enredo e o desfecho dos meus estudos e da minha história.

Agradeço aos meus avós paternos José Maciel e a Aurora Maciel e minha avó materna Neide Maria pela paciência e seus esforços para que meus estudos e sonhos se tornassem juntos uma realidade. Agradeço ao meu irmão Carlos e minha cunhada Priscila pelo auxílio e os momentos reflexivos nestes anos em construção e a meu irmão Felipe, cunhada Juliana e sobrinho Arthur por serem parte dessa história.

Agradeço a toda minha família e aos meus amigos pelo seu apoio diante de todos os novos desafios que decidi enfrentar, um especial reconhecimento a minha amiga Zasskia Gonzáles que ajudou na tradução deste trabalho e também aos meus companheiros de universidade que juntos me auxiliaram nas angústias diárias e no decorrer dessa etapa tão importante para a nossa formação.

Agradeço imensamente a meu orientador Aramys Reis por seus ensinamentos fornecidos generosamente e pacientemente ao longo de todos esses anos da minha formação, que certamente são estímulo para perpetuar o pensamento científico e auxiliar o processo de crescimento de nossa sociedade.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS

BBB Penetração de Barreira Hematoencefálica

CACO2: Capacidade Absorção Oral

CD36: Cluster Of Differentiation 36

D ambrosioides: Dysphania ambrosioides Adme

DAMPA'S: Padrões Moleculares Associados a Dano

EHB5: Grupo Extrato Hidroalcoólico na concentração 5mg/kg

EHB50: Grupo Extrato Hidroalcoólico na concentração 50mg/kg

EHDa; Extrato hidroalcoólico de Dysphania ambrosioides

EPCR: Receptor De Proteína C Endotelial

HE: Hematoxilina-Eosina

HIA: Absorção Intestinal Humana

Hz: Hemozoina

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

ICB-USP: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

IFN α : Interferon alfa

IFN β : Interferon beta

IFN γ : Interferon gama

IFN: Interferon

IFNAR: Receptores de interferon alfa

IL-1 β : Interleucina-1-beta

IL-12: Interleucina-12

IL-6: Interleucina-6

LIPE: Laboratório de Imunoparasitologia Experimental

MAC/PF: Complexo De Ataque á Membrana

max=máximo

MC: Malária Cerebral

MEC: Malária Cerebral Experimental

MHC: Complexo principal de Histocompatibilidade

min=mínimo

mn= mediana

MP: Mega Pixels

NK: Natural Killer Cell

NKT: Natural killer T

NLR/NOD: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors

OMS: Organização Mundial Da Saúde

P. berghei: Plasmodium berghei

PAMP'S: Padrões moleculares associados a patógenos

Pb A: Plasmodium berghei ANKA

Pfemp1: Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1

RIG: Receptores Do Tipo Indutível Pelo Ácido Retinóico

SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SNC: Sistema Nervoso Central

SNC: Sistema Nervoso Central

TLR: Receptores Toll-Like

TNF: Fator de Necrose Tumoral

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1

Vs: versus

RESUMO

Introdução: A malária é uma doença infecciosa de elevada mortalidade mundial. A infecção pelo *Plasmodium* gera lesões multissistêmicas nos mamíferos, com potencial evolução a gravidade, sendo essas associadas a agressão cerebral, pulmonar, hepática e outros. Novas formulações farmacológicas são necessárias para reduzir a mortalidade associada a malária cerebral, sendo o extrato hidroalcoólico *Dysphania ambrosioides* um potencial recurso terapêutico.

Métodos: Foram realizados testes químicos do extrato e seu potencial absorptivo através dos testes *in sílico*, na plataforma PreADMET 2.0. O estudo *in vivo* utilizou camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA HSP70, com posterior análise de tecido cerebral, pulmonar e hepático.

Resultados: Os potenciais de absorção das substâncias químicas demonstram baixa passagem pela barreira hematoencefálica e melhor absorção pela via oral e intestinal. Neste estudo, o uso do extrato hidroalcoólico *D. ambrosioides* demonstrou uma ação desfavorável quanto ao desfecho clínico neurológico dos animais, tornando-os mais vulneráveis e passíveis a mortalidade. Entretanto, através da análise histopatológica, podemos observar benefícios auxiliares nos tecidos pulmonar, hepático e esplênico.

Conclusão: As absorções distintas nos tecidos analisados, se associam às diferenças histopatológicas encontradas entre os tecidos, demonstrando assim potenciais ações do extrato nas vias imunopatológicas da malária cerebral. Estudos que compreendam as ações *D. ambrosioides* como potencial recurso terapêutico, nas distintas vias, auxiliariam em melhores desfechos nessa condição multissistêmica. A neoadjuvância farmacológica poderia auxiliar, com melhor ação dos compostos químicos nos diferentes tecidos, promovendo possíveis benefícios neste modelo de malária cerebral experimental.

Palavras-chave: Malária Cerebral. Investigação Laboratorial. Absorção
Chenopodium ambrosioides

ABSTRACT

Introduction: Malaria is an infectious disease of high global mortality. Plasmodium infection generates multisystemic lesions in mammals, with potential evolution to severity, being these associated to cerebral, pulmonary, hepatic aggression and others. New drugs are necessary to reduce the mortality associated with cerebral malaria being the hydroalcoholic extract *Dysphania ambrosioides* a potential therapeutic resource.

Methods: Chemical tests of the extract and its absorbent potential were carried out through in silico tests on the PreADMET 2.0 platform. In vivo studies C57BL / 6 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA HSP70 were used, with subsequent analysis of brain, lung and liver tissue.

Results: The absorption potential of the chemicals shows a low passage through the blood brain barrier and better absorption by the oral and intestinal routes. In this study the use of the hydroalcoholic extract *D. ambrosioides* showed an unfavorable action on the clinical neurological outcome of the animals making them more vulnerable and susceptible to mortality. However, through histopathological analysis, we can see similar benefits in lung, liver and splenic tissues.

Conclusion: The different absorptions in the analyzed tissues are associated to the histopathological differences found between the tissues, thus demonstrating potential actions of the extract in the immunopathological pathways of cerebral malaria. Studies investigating the mechanism of action of *D. ambrosioides* as a potential therapeutic resource in the different pathways would help to obtain better results in this multisystemic condition. Pharmacological combination of drugs could improve the action of chemical compounds in different tissues promoting possible benefits in this model of experimental cerebral malaria.

Keywords: Malaria, Cerebral. Laboratory Research. Absorption. *Chenopodium ambrosioides*

RESUMEN

Introducción: La malaria es una enfermedad infecciosa de elevada mortalidad mundial. La infección por Plasmodium genera lesiones multisistémicas en los mamíferos, con potencial evolución a la gravedad, siendo estas asociadas a agresión cerebral, pulmonar, hepática y otros. Nuevos fármacos son necesarios para reducir la mortalidad asociada a la malaria cerebral, siendo el extracto hidroalcohólico *Dysphania ambrosioides* un potencial recurso terapéutico.

Métodos: Se realizaron pruebas químicas del extracto y su potencial absorbente a través de las pruebas in silico, en la plataforma PreADMET 2.0. En los estudios in vivo se utilizaron ratones C57BL / 6 infectados con Plasmodium berghei ANKA HSP70, con posterior análisis de tejido cerebral, pulmonar y hepático.

Resultados: El potencial de absorción de las sustancias químicas demuestran un bajo paso por la barrera hematoencefálica y mejor absorción por la vía oral e intestinal. En este estudio, el uso del extracto hidroalcohólico *D. ambrosioides* demostró una acción desfavorable en cuanto al desenlace clínico neurológico de los animales, haciéndolos más vulnerables y susceptibles a la mortalidad. Sin embargo, a través del análisis histopatológico, podemos observar beneficios similares en los tejidos pulmonar, hepático y esplénico.

Conclusión: Las distintas absorciones en los tejidos analizados se asocian a las diferencias histopatológicas encontradas entre los tejidos, demostrando así potenciales acciones del extracto en las vías inmunopatológicas de la malaria cerebral. Estudios que investiguen el mecanismo de acción de *D. ambrosioides* como potencial recurso terapéutico, en las distintas vías, ayudarían a obtener mejores resultados en esta condición multisistémica. La combinación de fármacos podría mejorar la acción de los compuestos químicos en los diferentes tejidos, promoviendo posibles beneficios en este modelo de malaria cerebral experimental.

Palabras Clave: Malaria, Cerebral. Investigación de Laboratorio. Absorción.

Chenopodium ambrosioides

SUMÁRIO

Introdução	13
Metodologia.....	14
Extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> (EHDa)	14
Coleta do material vegetal	14
Preparo do extrato	15
Caracterização química do EHDa.....	15
Análise in silico	16
Interpretação do teste in sílico	16
Modelo Animal.....	17
Grupos.....	18
Avaliação da Temperatura.....	18
Avaliação da Evolução Clínica.....	18
Avaliação da Parasitemia	19
Preparo Histológico e Análise	19
Análise estatística.....	20
Resultados:	20
Parasitemia, Temperatura e Evolução Clínica	20
Peso esplênico e contagem de esplenócitos	22
Análise Histopatológica	23
Análise Barreira Hematoencefálica, Absorção Intestinal e Absorção Oral	29
Conclusão	39
Declaração de ausência de conflitos de interesse	39
Financiamento.....	39
Referências	40

Malaria Journal

Research

Análise do potencial terapêutico do extrato hidroalcoólico da *Dysphania ambrosioides* L. em um modelo de malária cerebral

Luiz Henrique A. Maciel¹ Aramys S. Reis^{1,2}

Address: ¹Laboratório de Fisiopatologia e Intervenção terapêutica, Prédio de Medicina Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, MA, Brasil; Av. da Universidade, s/n, Dom Afonso Felipe Gregory CEP: 65915-240 Imperatriz- MA; ²Laboratório de Imunofisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA, Brasil Av. dos Portugueses s/n, Prédio do Integrado, Bloco 1, Sala 1A, Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga, CEP: 65085-580 São Luís, Maranhão – Brasil.

Email: Luiz Henrique Alves Maciel-luizhamaciel@hotmail.com; Aramys Silva dos Reis*-aramysfar@gmail.com

*Corresponding Author

Abstract

Background: Malaria is an infectious disease of high global mortality. Plasmodium infection generates multisystemic lesions in mammals, with potential evolution to severity, being these associated to cerebral, pulmonary, hepatic aggression and others. New drugs are necessary to reduce the mortality associated with cerebral malaria being the hydroalcoholic extract *Dysphania ambrosioides* a potential therapeutic resource.

Methods: Chemical tests of the extract and its absorbent potential were carried out through in silica tests on the PreADMET 2.0 platform. In vivo studies C57BL / 6 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA HSP70 were used, with subsequent analysis of brain, lung and liver tissue.

Results: The absorption potential of the chemicals shows a low passage through the blood brain barrier and better absorption by the oral and intestinal routes. In this study the use of the hydroalcoholic extract *D. ambrosioides* showed an unfavorable action on the clinical neurological outcome of the animals making them more vulnerable and susceptible to mortality. However, through histopathological analysis, we can see similar benefits in lung, liver and splenic tissues.

Conclusion: The different absorptions in the analyzed tissues are associated to the histopathological differences found between the tissues, thus demonstrating potential actions of the extract in the immunopathological pathways of cerebral malaria. Studies investigating the mechanism of action of *D. ambrosioides* as a potential therapeutic resource in the different pathways would help to obtain better results in this multisystemic condition. Pharmacological combination of drugs could improve the action of chemical compounds in different tissues promoting possible benefits in this model of experimental cerebral malaria.

Keywords: Malaria, Cerebral. Laboratory Research. Absorption. *Chenopodium ambrosioides*

Introdução

A malária é uma doença infecciosa de elevada mortalidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que houve 219 milhões de casos e 435.000 mortes em 2017(1). A sintomatologia da malária é inespecífica, tornando o diagnóstico desafiador diante de outros diagnósticos diferenciais. Inicialmente associada à ruptura de eritrócitos parasitados, que causam uma intensa ativação do sistema imune(2).

Nas infecções por *Plasmodium falciparum*, espécie mais virulenta, a ausência de um diagnóstico precoce e tratamento adequado, podem evoluir para a forma complicada, denominada malária grave. A manifestação da malária grave é dependente da idade do paciente e de uma exposição prévia ao parasito(3). Esta síndrome é uma doença multissistêmica capaz de causar malária cerebral (MC), e outras complicações como lesão pulmonar, hepática, esplênica, renal e placentária(3).

Considera-se na patogênese da MC duas condições: a primeira, resultante do desequilíbrio na resposta imune pró-inflamatória e anti-inflamatória, desencadeando uma patologia imuno induzida, esta pode ser uma das principais causas da MC, que por conseguinte pode ser amplificada ainda mais pelo sequestro eritrocitário(4). E a segunda, o sequestro, em que ocorre em vários órgãos e, juntamente com o aumento da rigidez dos eritrócitos, acredita-se causar oclusão vascular (5).

Como a patogênese da MC não é completamente compreendida, investigações são uma importante prioridade da pesquisa médica, especialmente no contexto de terapias adjuvantes. Vários modelos de MC têm sido desenvolvidos em macacos, ratos e camundongos, embora nenhum destes modelos represente exatamente a síndrome humana, eles podem auxiliar para compreensão da MC humana (6,7). Estratégias de tratamento, que não apenas visem o parasita, mas também outros mecanismos subjacentes à patogênese do MC, precisam ser desenvolvidas.

As folhas e o óleo das sementes de *Dysphania ambrosioides* L., vêm apresentando potencial terapêutico para a MC e para outras condições, sendo uma planta conhecida no Brasil como '*mastruz*', tem sido usada por povos nativos para tratar doenças parasitárias. Além do conhecimento popular, estudos vêm demonstrando ação anti-inflamatória, antileishmanicida, antimalárica e outros do *D. ambrosioides* (8). A utilização de metodologias validadas como os testes *in silico* e *in vivo* podem auxiliar na compreensão dos efeitos da *D. ambrosioides* nos modelos de MC.

Segundo Ferreira et al. (9) os testes *in silico* são recursos utilizados na atualidade com eficácia reconhecida para o desenvolvimento de fármacos. Estes podem ser utilizados para analisar o potencial de absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME) e toxicidade de fármacos. Uma alternativa para este teste é o aplicativo baseado na web PreADMET sendo capaz de prever dados ADME e criar uma biblioteca de drogas, através da previsão de comportamentos semelhantes para estruturas químicas similares, auxiliando assim a compreensão da farmacocinética de uma molécula candidata a fármaco.

Para a compreensão da MC e de potenciais alvos farmacológicos, os estudos *in vivo* em modelos validados são uma alternativa (4). Estes modelos auxiliam contribuindo com dados de desenvolvimento parasitário, resposta biológica, parâmetros clínicos e histológicos semelhantes aos humanos(10). Dessa forma, este trabalho visa utilizar o modelo de animais C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei*, para compreender a atividade sistêmica da *D. ambrosioides* através dos parâmetros clínicos, sorológicos e análise histopatológica.

Metodologia

Extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* (EHDa)

Coleta do material vegetal

A coleta das folhas de *D. ambrosioides* foi efetuada na cidade de Raposa-MA, bairro do Alto do Farol (2° 27' 34,6" S / 44° 08' 47,5" W), adquiridas de produtores locais. A identificação botânica foi realizada no herbário do Maranhão-MAR, da Universidade Federal do Maranhão, com o voucher de Nº 9349. A coleta do material vegetal ocorreu no mês de abril de 2017, por volta das 8 horas, de modo a conservar, qualitativa e quantitativamente os metabólitos secundários da planta (11).

Preparo do extrato

Para o preparo do extrato, seguiu-se o protocolo adaptado de Neiva et al. (11) em que as folhas foram mantidas em estufa a 37°C para secagem, seguido de trituração em moinho de facas para obtenção do pó, com um resultado de 250g da matéria prima. O pó foi então intumescido por 2 horas em 1L de solução hidroalcoólica a 70% de etanol. Em seguida, foi submetido a um processo de extração exaustiva por 17 dias, usando a mesma solução do intumescimento. Segundo Gomes (12) esta extração exaustiva consiste em percolar a amostra até o momento que a solução apresenta coloração mais clara e estável

Caracterização química do EHDa

O EHDa utilizado foi fornecido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Imunofisiologia –UFMA que seguiu a metodologia apresentada por Gomes (12) em que para a análise da composição química do EHDa foi encaminhada uma amostra para Laboratório de Produtos Naturais/ Campus do Litoral Paulista – Unesp - São Vicente por intermédio da professora Claudia Rocha. A amostra passou por FIA-ESI-IT-MSn (Espectrometria de Massas por infusão direta com fonte eletronspray e analisador ion trap), na qual foram dissolvidos 10 mg do extrato hidroalcoólico bruto em 1 ml de MeOH:H₂O (1:1,v/v) depois de se utilizar um banho de ultrassom durante

5 minutos. As amostras foram então filtradas através de um filtro PTFE de 0,22 μm , e alíquotas de 20 μL foram injetadas diretamente no sistema FIA-ESI-IT-MSn.

A infusão do fluxo direto das amostras foi realizada em um analisador do tipo *ion trap* linear Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se um tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, voltagem do spray de 5,00 kV, tensão capilar de -90 V, lentes de tubo de -100 V e um fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A análise completa da varredura foi registada na faixa de m/z de 100-1000. As fragmentações em estádios múltiplos (ESI-MSn) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento de varredura foi um espectro de massa completo para adquirir dados sobre íons nessa faixa de m/z. O segundo evento de varredura foi uma experiência MS/MS realizada utilizando dados dependentes nas moléculas [M-H] dos compostos de interesse com energia de colisão de 30% e tempo de ativação de 30 ms. Os íons produzidos foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos. A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico foi feita comparando seus tempos de retenção e espectros UV com dados da literatura conforme Saldanha (13).

Análise in silico

Para o teste *in silico* as estruturas químicas foram retiradas do PubChem (14), plataforma química digital e montadas no aplicativo baseado na web PreADMET 2.0, este prevê distintos parâmetros das drogas, baseado em semelhanças químicas de sua biblioteca digital (15–17)

Interpretação do teste in silico

Foram analisados três parâmetros no teste *in sílico*. Os valores para avaliar potencial de penetração de barreira hematoencefálica (BBB), os desenvolvedores consideraram os estudos de Chen et al.(15), Ajay et al.(18) e Lobell et al.(19), estes utilizam a classificação para BBB (cérebro C/ sangue C). Dessa maneira para este estudo foram considerados três estágios potenciais de absorção: Alta absorção para o SNC valores > que 2.0; Absorção média do SNC para valores entre 2,0-0,1 e Baixa absorção do SNC para valores < que 0,1(19). Para a Absorção Intestinal Humana (HIA) é classificada em percentual por Yuan (17), os autores classificam os compostos em má absorção os que estão na faixa de 0-20%; em compostos moderadamente absorvidos entre 20-70% e os compostos bem absorvidos no intervalo de 70-100%. E Yamashita (16) apresenta a classificação para absorção oral (CaCo₂) em (nm/seg), sendo de baixa permeabilidade, valores < 4; a permeabilidade intermediária de 4-70 e de alta permeabilidade > que 70. Posteriormente os dados da BBB, HIA e CaCo₂ foram convertidos em *cruzes* para análise semi quantitativa. Uma *cruz* (+) representa baixa absorção, duas *cruzes* (++) absorção intermediária e três *cruzes* (+++) alta absorção.

Modelo Animal

O estudo experimental foi realizado em um grupo controle randomizado com dezesseis camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 3/4meses de idade. Estes animais foram criados e mantidos em uma instalação livre de patógenos no Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) em dieta regular. Os camundongos foram então transferidos para o Biotério de Camundongos de Parasitologia no ICB-USP II, alojados em número máximo de cinco animais por gaiola, e mantidos sob temperatura e humidade controladas, com ciclos de 12 horas claro/escuro. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de

Ética em Pesquisa Nº 23115.005011/2017-41. Este estudo observou o quantitativo de parasitemia, peso esplênico e quantitativo de esplenócitos, histopatológico cerebral, pulmonar e hepático.

Grupos

O *Plasmodium berghei ANKA HSP70* foi obtido no Laboratório de Imunoparasitologia Experimental (LIPE) da USP. Foram criados cinco grupos com camundongos C57BL/6, sendo o controle limpo animais não infectados (n=3), tratados com solução salina RPMI. Os demais grupos foram inoculados com 10^6 eritrócitos infectados por *P. berghei ANKA* via intraperitoneal, para indução de malária cerebral. No grupo Infectado foi usada solução salina RPMI como grupo controle não tratado (n=3), o grupo EHB5 foi tratado com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* na dose 5mg/ml/kg (n=4); o grupo EHB50 tratado com extrato na dosagem de 50mg/ml/kg (n=3) e por fim o grupo Cloroquina, considerados como controle tratado na dose 45 mg/kg (n=3). Os grupos foram tratados e observados por um período de seis dias. Seguindo os critérios de Carroll (3) quanto a má evolução clínica, associada à parasitemia e ao tempo médio esperado para o desenvolvimento (MC) o sexto dia foi selecionado para a eutanásia dos animais.

Avaliação da Temperatura

Foi realizada diariamente a aferição da temperatura utilizando o Termômetro (Termopar Digi-Sense, Tipo J / K / T, Calibração Rastreável por NIST) com aferição do canal anal utilizando sensor metálico associado a lubrificante a base de água.

Avaliação da Evolução Clínica

A avaliação clínica considerou os parâmetros de Carroll (3), sendo considerada uma escala máxima de pontuação de 20 pontos divididos entre: marcha, equilíbrio,

desempenho motor ,posição do corpo, força dos membros, fuga de toque, reflexo pavilhão auricular, beliscão dedo do pé, agressão e *grooming*.

Avaliação da Parasitemia

Para a parasitemia foram retirados diariamente 2µl de amostra de sangue através de incisão na ponta da cauda e analisadas por citometria de fluxo, utilizando o Facscalibur e o programa Cellquest pro versão 5.2.

Preparo Histológico e Análise

O baço foi retirado e pesado logo após a eutanásia dos animais e posteriormente macerado para contagem de esplenócitos. Os demais órgãos foram fixados em solução de formaldeído (10%) por 24-48h, desidratados em solução de etanol, embebidos em blocos de parafina, seccionados com 4µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina (HE). Sendo realizado corte coronal na porção medial do cérebro excluindo o cerebelo. O pulmão e lobo direito do animal foram retirados para o preparo histológico.

Com objetivo realizar a análise às cegas, as lâminas foram numeradas aleatoriamente sem que fosse realizada identificação das mesmas para que a patologista. A profissional realizou a análise por microscopia óptica (Microscópio Biológico Série NOVA 180) nas objetivas 4x; 10x; 40x; 100x com imersão, classificadas semi-quantitativamente. A análise *semi-quantitativa* em *cruzes* utilizada considera uma cruz (+) valor mínimo encontrado, sendo assim baixa apresentação da alteração patológica, selevando a classificação de acordo com o maior quantitativo de achados, ou seja, duas cruzes (++) , três cruzes (+++) , quatro cruzes (++++) sendo este valor máximo encontrado. Para alguns achados foram considerados apenas sua presença ou ausência no tecido, sem assim classifica-los em cruzes.

Foram considerados para encéfalo os respectivos achados: hipercromasia, vacuolização, edema (análise em *cruzes*), parasita e focos hemorrágicos (presença/ausência). No pulmão congestão, processo inflamatório, edema alveolar (semi-quantitativo), presença de parasita e focos hemorrágicos (ausência/presença) e por o Fígado a análise semi-quantitativa considera colestase, vacuolização, edema e quanto a presença e ausência o processo inflamatório e presença de parasita.

As fotos foram retiradas no Microscópio OPTICAM O400S STANDARD utilizando o software OPTICAM Câmera Científica OPT 14.3 MP (Resolução: 14.3 Mega Pixels) nas objetivas de 10x, 40x e 100x em óleo de imersão segundo indicado.

Análise estatística

Para os dados com distribuição normal foi usado o teste paramétrico One-way-ANOVA, com pós-teste de Turkey. Caso não apresentassem distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's. As análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism v.5.3 (GraphPad Inc., La Jolla, CA).

Resultados:

Parasitemia, Temperatura e Evolução Clínica

A análise da *parasitemia*, *temperatura* *evolução clínica*, são dados importantes para compreender quais animais desenvolveram a MC, assim como analisar as possíveis influencias do extrato nos grupos tratados no período de seis dias. A **Figura 1** apresenta tais parâmetros ao longo de seis dias de tratamento, na **Figura1A** demonstra se *parasitemia* em percentual (%) após 10.000 eventos pelo citômetro. As diferenças ao longo do estudo iniciam no quarto dia após infecção comparando o grupo cloroquina aos demais grupos com valor ($p < 0,001$). É importante observar que o grupo EHB50 apresenta aumento acentuado de sua parasitemia, com distinção aos demais

grupos. Apesar de menor parasitemia o EHB5 apresenta ($p < 0,01$) comparado ao grupo infectado, demonstrando assim uma elevação acentuada nos grupos tratados com o extrato.

A queda da temperatura (hipotermia) é um importante parâmetro da evolução dos animais com MC. A **Figura 1B** representada a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) no período de seis dias. As diferenças estatísticas entre os grupos majoritariamente ocorreram no sexto dia, sendo estes: infectado vs EHB50 com ($p < 0,01$), infectado vs cloroquina ($p < 0,05$). EHB5 vs cloroquina ($p < 0,001$) excetuando o EHB50 vs cloroquina que no quinto e

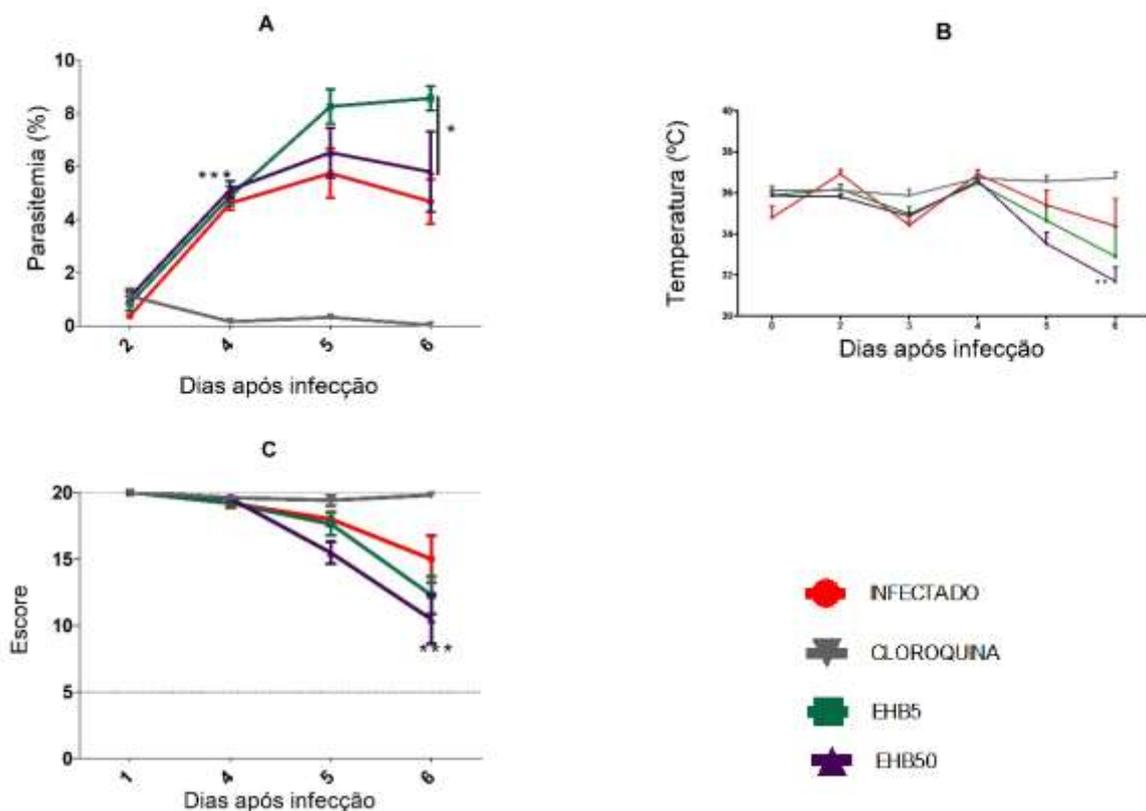


FIGURA 1: **A:** representando percentual de Parasitemia. **B:** apresentando Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e Gráfico **C:** apresentando escore de Comportamento segundo Carroll (2). Dados analisados de em animais C57BL/6 infectados com P berghei ANKA em seis dias; Grupo controle Infectado: animais infectados com PbA tratado com solução salina ($n=3$); Grupo controle cloroquina tratado com 45 mg/kg ($n=3$); Grupo EHB5 tratado com C ambrosioides na concentração de 5mg/ml/kg ($n=4$); Grupo EHB50 tratado com C ambrosioides na concentração de 50mg/ml/kg ($n=3$). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

sexto dia apresentam ($p < 0,001$). Demonstrando uma maior queda da temperatura nos animais tratados com o extrato, comparado aos grupos controle.

A evolução clínica de animais modelos com MC (3) é um outro parâmetro importante para análise e resposta aos fármacos nos grupos estudados. As alterações encontradas são condizentes com as encontradas na temperatura, são estatisticamente demonstradas no sexto dia entre Infectado vs EHB50 ($p < 0,01$) infectado vs cloroquina ($p < 0,01$), EHB5 vs cloroquina ($p < 0,001$), quando analisados os grupos EHB50 vs cloroquina se observa uma alteração mais precoce no quinto dia ($p < 0,05$) e no sexto ($p < 0,001$), demonstrando uma pior evolução dos animais tratados com o extrato.

Peso esplênico e contagem de esplenócitos

O peso esplênico e a contagem de esplenócitos podem auxiliar na compreensão da resposta inflamatória sistêmica da malária e parasitária. A **Figura 2** demonstra o peso

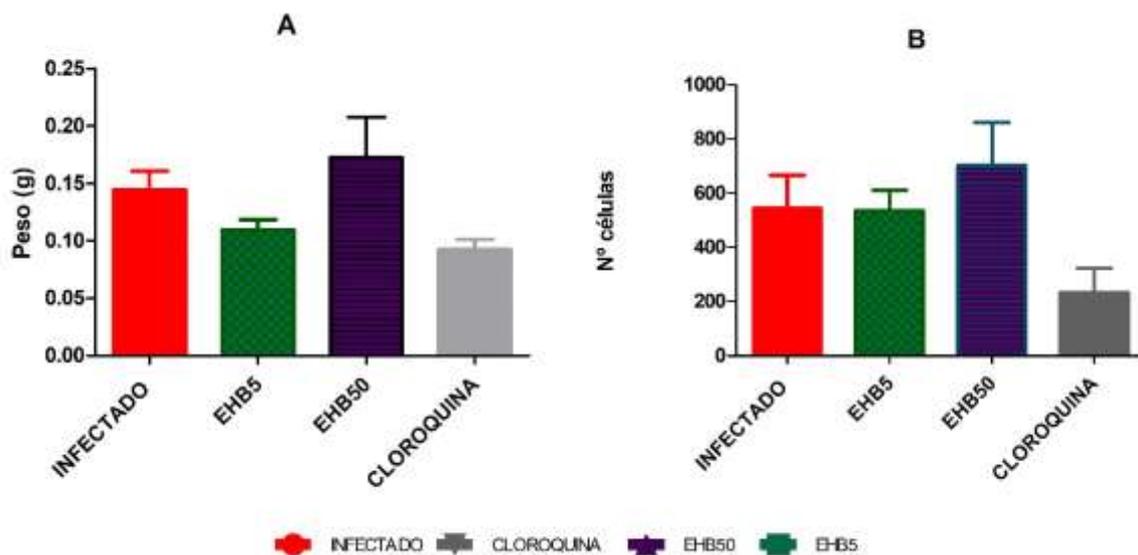


Figura 2:A: representando peso do baço pós eutanásia; **B:** Contagem de esplenócitos após eutanásia. Dados analisados em animais C57BL/6 infectados com P berghei ANKA em seis dias; Grupo controle Infectado: animais infectados com PbA tratado com solução salina (n=3); Grupo controle cloroquina: tratado com 45 mg/kg (n=3); Grupo EHB5: tratado com C ambrosioides na concentração de 5mg/ml/kg (n=4); Grupo EHB50: tratado com C ambrosioides na concentração de 50mg/ml/kg (n=3).

esplênico e contagem de esplenócitos e ambos os gráficos não existem diferenças estatísticas.

Análise Histopatológica

As lâminas correspondentes ao tecido nervoso central (SNC), foram preparadas realizando um corte coronal do encéfalo de camundongos C57BL/6. A **Tabela 1** apresenta as alterações encontradas e estratificadas entre os grupos estudados. Os principais achados levantados foram hiper Cromasia celular, vacuolização e edema, estes foram classificados através de análise semi-quantitativa em *cruzes*, sendo (+) baixa apresentação a (+++++) máxima apresentação e para *parasita* e *focos hemorrágicos* registra se segundo sua presença ou ausência. Na **Figura 3** apresenta as imagens de microscopia óptica do sistema nervoso central em aumento de **40x**.

Ao analisar hiper Cromasia a mediana de EHB5 é maior entre os grupos [$mn=3$], com diferenças no cloroquina vs EHB5 de ($p<0.05$). Nas imagens é possível observa

TABELA 1				
	Infectado	Cloroquina	EHB5	EHB50
Hiper Cromasia	2 (2)	1 (1-2)	3 (2-3)*	2 (1-2)
Vacuolização	1 (1)	1 (1)	2 (1-2)	1 (1-2)
Edema	2(1-2)	1(1)	2(2)*	2 (2-3)**
Parasita	3/3	2/3	2/4	1/3
Focos hemorrágicos	3/3	2/3	4/4	2/3

Tabela 1: Análise histopatológica semiquantitativa de tecido cerebral do C57BL/6. Nos quadros a mediana ($mn=$) e entre parênteses os valores mínimo e máximo (min/max) encontrados no grupo. Para parasita e focos hemorrágicos registra se segundo sua presença ou ausência, no numerador indica os animais com a presença do achado histológico e no denominador o número total de animais por grupo. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

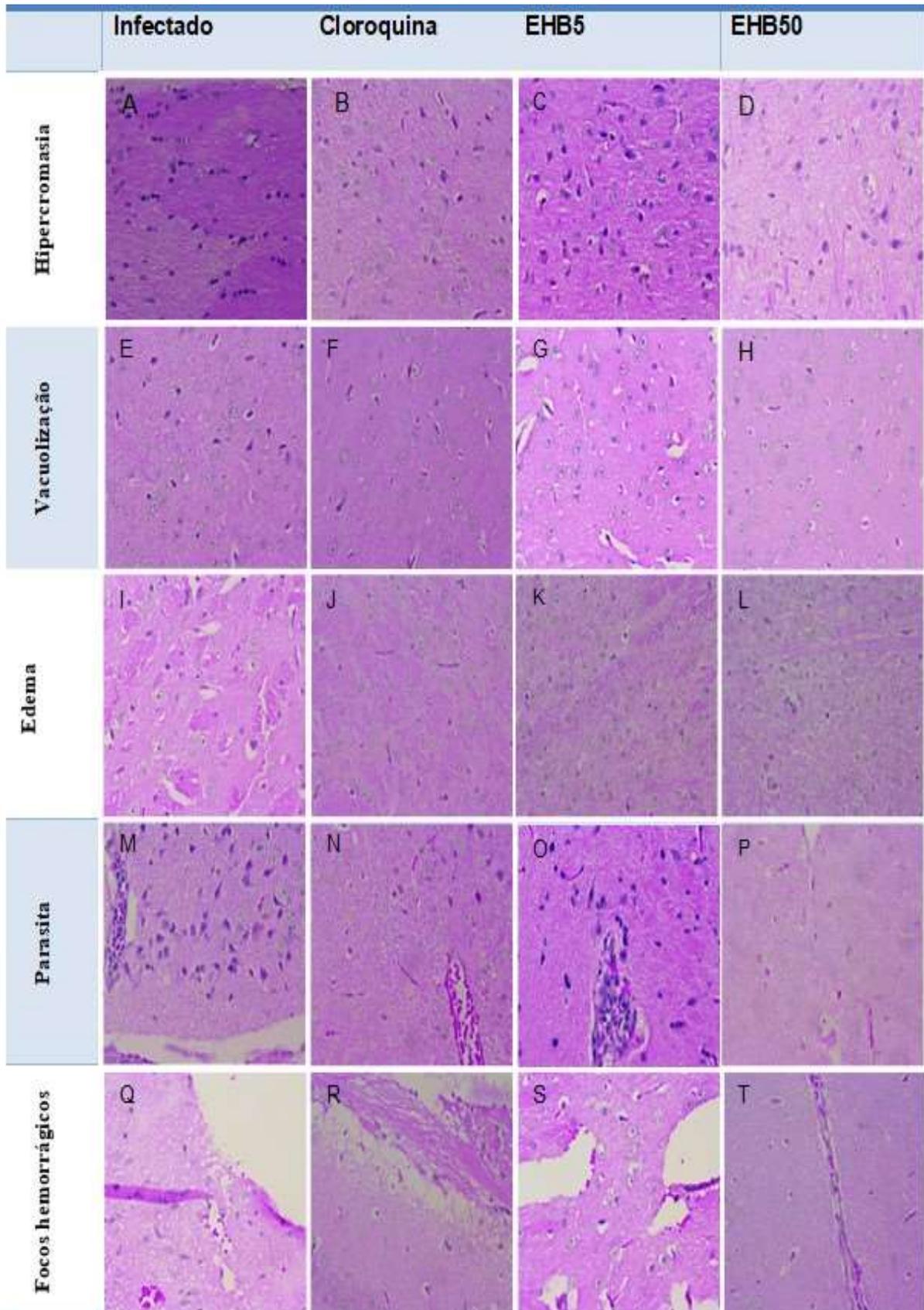


Figura 3: Fotos de microscopia de Tecido Cerebral de C57BL/6. No grupo (A, E, I, M, Q) Infectado foi usada solução salina RPMI como controle do tratamento (n=3), (C, G, K, O, S) EHB5 tratados com extrato na dose 5mg/ml/kg (n=4), (D, H, L, P, T) EHB50 tratados com extrato na dosagem de 50mg/ml/kg (n=3) e o (B, F, J, N, R) Cloroquina considerados como controle tratado com a medicação na dose 45 mg/kg (n=3).Objetiva de 40x

padrão hipercromático celular acentuado nos grupos infectado e EHB5, distinguindo dos grupos cloroquina e EHB50 com menor hipercromasia.

A vacuolização em todos os grupos foi classificada de baixa intensidade, porém os grupos tratados com *D. ambrosioides* apresentam maiores valores de máximo e mínimo tendo como vacuolização mais acentuada nos grupos analisados EHB5 [2 (1-2)] e EHB50 [1(1-2)]. Na **Figura3G** é possível visualizar maior vacuolização celular, com ausência de vaso congestão e com elevada tumefação aguda da oligodendróglia. O edema apresentado no SNC foi menor no controle tratado com cloroquina [mn=1] conforme esperado e a mesma mediana [mn=2] para os demais grupos. Como é possível visualizar no edema a distanciamento das fibras, com diminuição da eosinofilia, características visualizadas no grupo infectado e tratados com o extrato hidroalcoólico. Na **Figura3O** é possível visualizar vaso oclusão com presença de células inflamatórias e eritrócitos aderidos com redução da integridade da parede vascular.

Na classificação para parasita e focos hemorrágicos, foi considerada sua presença e sua ausência. O grupo EHB50 [1/3] possui menor número de animais com presença de parasita entre todos os grupos analisados e para os focos hemorrágicos foram

TABELA 2				
	Infectado	Cloroquina	EHB5	EHB50
Congestão	1 (1-1)	2 (1-3)	2 (1-3)	1(1-2)
Processo inflamatório	1 (1-1)	1 (1-2)	2(1-3)	1 (0-3)
Edema alveolar	2(2-2)	1(1-1)	2(1-2)	1 (1-3)
Parasita	3/3	0/3	1/4	0/3
Focos hemorrágicos	2/3	3/3	4/4	1/3

Tabela 2: Análise histopatológica semiquantitativa de tecido pulmonar do C57BL/6. Nos quadros a mediana e entre parênteses os valores mínimo e máximo de cada grupo. Para parasita e focos hemorrágicos registra se segundo sua presença ou ausência o número total de animais por grupo. *p<0,05;**p<0,01;***p<0,001

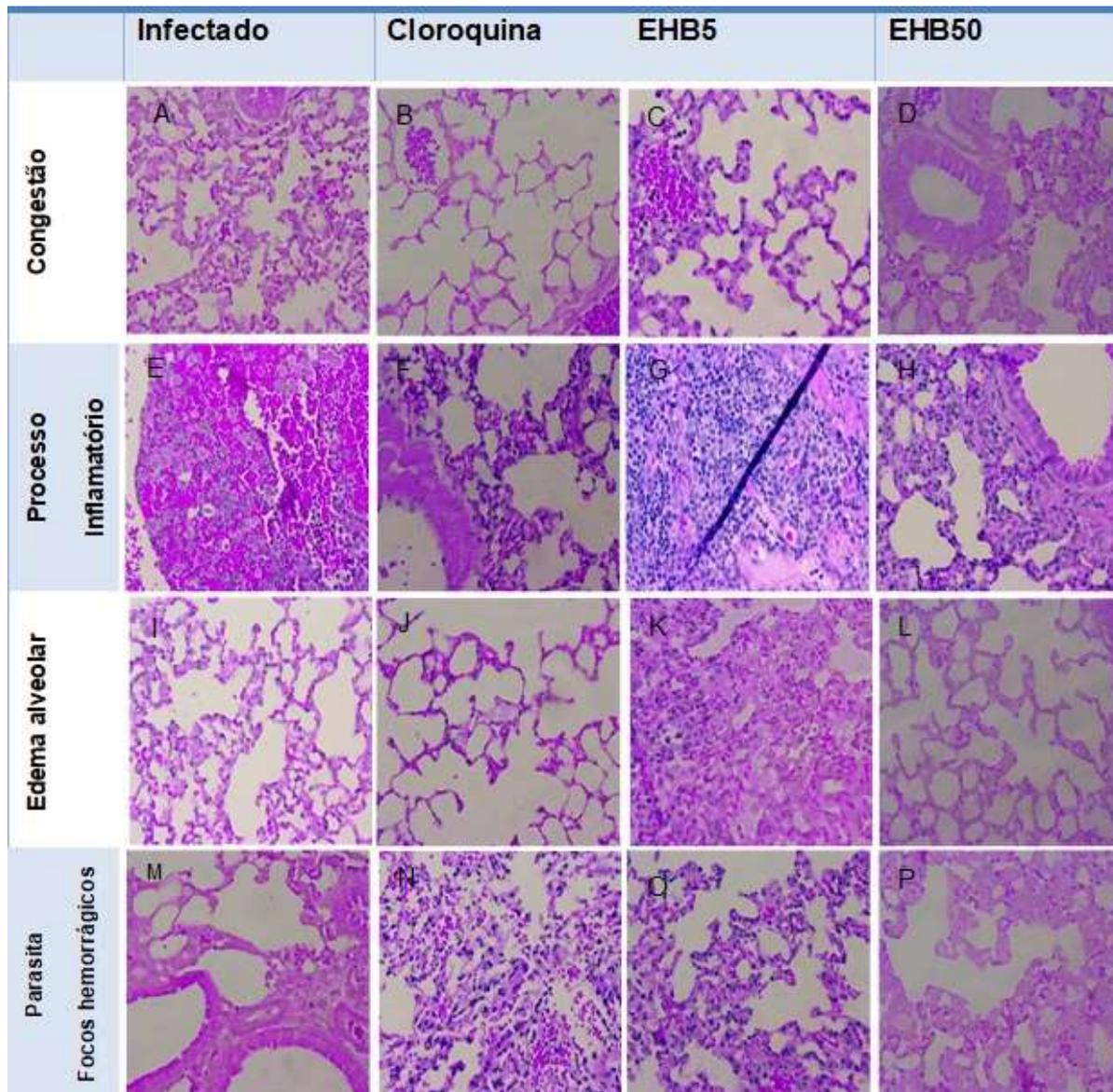


Figura 4: Fotos de microscopia de Tecido Pulmonar do C57BL/6, infectados com *P. berghei ANKA*. No grupo (A, E, I, M) Infectado foi usada solução salina RPMI como controle do tratamento (n=3), (C, G, K, O) grupo EHB5 tratados com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* na dose 5mg/ml/kg (n=4), (D, H, L, P) grupo EHB50 tratados com extrato na dosagem de 50mg/ml/kg (n=3) e o (B, F, J, N) grupo Cloroquina considerados como controle tratado com a medicação na dose 45 mg/kg (n=3). Fotos retiradas na objetiva de 40x.

menores no Cloroquina e EHB50 [2/3]; diferindo assim do infectado e EHB5 em todos os animais apresentaram o achado. É possível visualizar nas imagens adesão de eritrócitos a parede vascular, com extravasamento eriocitário de pouca intensidade.

Para análise histológica do tecido pulmonar apresentado na **Tabela 2** foram considerados *congestão*, *processo inflamatório* e *edema alveolar* e classificados em

cruzes e para *parasita* e *focos hemorrágicos* registra-se segundo sua presença ou ausência. Na **Figura 4** é possível visualizar através de microscopia ótica os grupos e seus respectivos achados no tecido pulmonar.

A congestão foi a mesma para o controle tratado e EHB5, sendo estas maiores no controle não tratado e EHB50. Com possível visualização em todas as **Figuras 4A, 4B, 4C e 4D**. o processo inflamatório em EHB5 foi maior comparado aos demais grupos que apresentaram a mesma mediana, porém foi encontrado valor máximo no grupo EHB50. Nas imagens é possível visualizar intensa resposta inflamatória com elevado número de linfócitos. Apesar de EHB50 apresentar maior valor máximo, o edema alveolar no Cloroquina e no EHB50 apresentam mesma mediana, sendo estes valores menores quando comparados aos grupos infectado e EHB5. É possível visualizar nas **Figura 4J e 4L** alvéolos livres diferindo da **Figura 4K** com ausência de aeração alveolar.

Quando analisado a presença e a ausência do parasita e dos focos hemorrágicos conforme esperado todos os animais no grupo infectado foram encontrados parasita. Nos demais EHB5 foi encontrado em baixo número e os demais grupos com total ausência do achado entre os animais. Quanto a hemorragia apresenta se uma

TABELA 3

	Infectado	Cloroquina	EHB5	EHB50
Colestase	2 (1-2)	0 (0)**	1(1-2)*	1(0-1)
Vacuolização	3(2-4)	1(1)*	2(2-3)	2(1-3)
Edema	3(3)	1(1-2)*	2(2)**	2(2)**
Inflamação	1/3	1/3	¼	3/3
Parasita	0/3	0/3	¼	0/3

Tabela 3: Análise histopatológica semiquantitativa de tecido hepático do C57BL/6. Nos quadros a mediana e entre parênteses os valores mínimo e máximo de cada grupo. Para parasita e inflamação registra se segundo sua presença ou ausência. *p<0.05;**p<0.01;***p<0.001

inversão dos dados anteriores onde o Cloroquina e EHB5 todos apresentam elevado número de animais com focos hemorrágicos e o EHB50 baixo número de animais apresentaram o achado, indicando um possível benefício do extrato em maiores concentrações.

Na **Tabela 3** é visualizar a análise semi-quantitativa do tecido hepático considerando a *colestase*, *vacuolização celular* e *edema tecidual*. As lâminas histológicas do tecido hepático podem ser visualizadas na **Figura 5**. Para a colestase o grupo Infectado apresenta maior mediana, comparado aos demais grupos, tendo os grupos tratados com “mastrus” um pequeno aumento [1], e o cloroquina com ausência total deste achado, fornecendo diferença ($p < 0,05$). A vacuolização celular foi maior [3] no

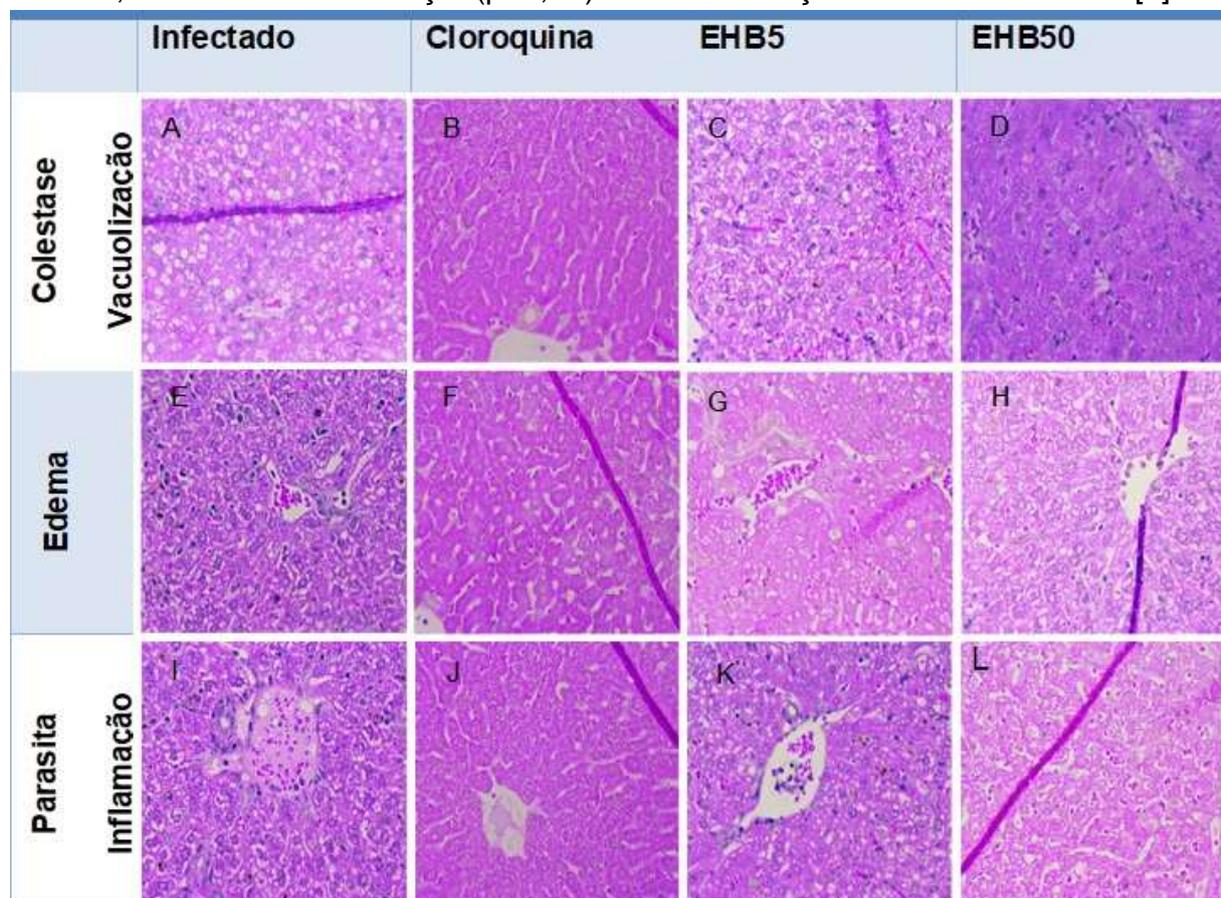


Figura 5: Fotos de microscopia de Tecido Hepático do C57BL/6, infectados com P berghei ANKA. No grupo (A, E, I) Infectado foi usada solução salina RPMI como controle do tratamento (n=3), (C, G, K) grupo EHB5 tratados com extrato hidroalcoólico de D. ambrosioides na dose 5mg/ml/kg (n=4), (D, H, L) grupo EHB50 tratados com extrato na dosagem de 50mg/ml/kg (n=3) e o (B, F, J) grupo Cloroquina considerados como controle tratado com a medicação na dose 45 mg/kg (n=3). Fotos retiradas na objetiva de 40x

infectado não tratado comparado aos demais grupos, seguido de valores menores [2] nos tratados com *D. ambrosioides* e controle tratado com [1] apresentando assim uma diferença de ($p < 0,05$) apenas entre a cloroquina e o infectado. O edema no tecido hepático apresentou o mesmo padrão sendo maior no Infectado e no EHB5 com ($p < 0,05$) comparado aos tratados com Cloroquina. Apesar do grupo EHB50 apresentar a mesma mediada do tratado em baixas doses, não há diferenças encontradas quando contrapostas ao grupo Cloroquina. Como realizado em outros tecidos para inflamação e o parasita foram considerados como presentes ou ausentes. Sendo a inflação presente em todos os animais dos tratados em alta concentração do extrato e para os demais grupos ambos apenas um animal por grupo apresentou inflamação. Quanto a presença do parasita no tecido somente um animal foi identificado no grupo EHB5.

Análise Barreira Hematoencefálica, Absorção Intestinal e Absorção Oral

A **Tabela 4** apresenta a análise química do *D. ambrosioides*, e a análise da do potencial de absorção da barreira hematoencefálica (BBB), absorção intestinal (HIA) e absorção oral (CaCO_2). Das dezesseis substâncias levantadas duas não se apresentavam no PubChem a *Kaempferol-O-ramosideo-pentosídeo* e *Kaempferol-O-pentosideo-ramnosideo-hexosideo*, sendo assim como apresentam o Kaempferol em sua estrutura, essa última foi considerada isoladamente.

A análise permite visualizar quem o Kaempferol e Quercetina são as substâncias mais presentes no “mastruz”. Quando analisado a BBB dez [10] destas apresentam baixa absorção, e seis [6] apresentam absorção intermediária. Quando se analisam apenas Kaempferol e Quercetina apenas o primeiro isolado apresenta absorção intermediária. Para HIA seis [6] apresentam baixa absorção, seis [6] absorção intermediária e quatro [4] alta absorção. Por fim quanta a absorção oral CaCO_2 duas [2] apresenta baixa

absorção e quinze [14] absorção intermediária. Demonstrando assim as vias de administração oral e intestinal potenciais vias de absorção farmacológica do extrato.

TABELA 4

ORDEM	Substâncias	BBB	HIA	CaCO ₂
1	Ácido quínico	++	++	++
2	Ácido glucorônico	++	++	+
3	Kaempferol	++	+++	++
4	Ácido p-coumaroil-xilose	+	++	++
5	Hesperetina	++	+++	++
6	Kaempferol-3-O-alfa-L-raminosideo	+	++	++
7	Quercetina-3-O-glicosideo	+	++	++
8	Kaempferol-O-ramosideo-pentosideo	++#	+++#	+++#
9	Quercetina O-raminosideo-pentosideo	+	+	++
10	Naringin	+	+	++
11	Kaempferol-3-Glucoside-3 " - Rhamnoside	+	+	++
12	Quercetina-3-O-arabinoglucosideo	+	+	++
13	Isoramnetina-3-O-rutinosideo	+	+	++
14	Quercetina-3-O -rutinosideo	+	++	++
15	Kaempferol-3-Glicosideo-2 " - Rhamnosideo-7-Rhamnoside	+	+	+
16	Kaempferol-O-pentosideo-ramnosideo-hexosideo	++#	+++#	+++#

Tabela 4: Tabela apresentando em ordem crescente a composição química do extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*. BBB representa potencial de penetração em barreira hematoencefálica. O HIA representa potencial de absorção intestinal humana e o Caco2 representa a absorção oral de drogas. Classificação semi quantitativa em cruces sendo (+) baixa absorção, (++) média absorção e (+++) alta absorção.

Discussão

A compreensão do mecanismo fisiopatológico da malária cerebral é de suma importância quando se avalia os efeitos dos fármacos nessa condição. Neste estudo

os achados histológicos correlacionando aos achados clínicos do modelo permitem avaliar o potencial do *D. ambrosioides* como possível alvo terapêutico.

Como visto os parâmetros clínicos no período de seis dias do estudo, demonstram uma piora significativa nos animais tratados com o extrato de *D. ambrosioides*. Indicando uma possível agressão sistêmica durante o período de análise. Ambos parâmetros analisados demonstram uma maior resposta dos animais contra a infecção, as custas de elevada parasitemia. Demonstrando um possível antagonismo levantados na literatura, que indicam benefícios antimalárico (20) e anti-inflamatórios em outros modelos (21,22). Buscando assim complementar a compreensão da atividade do extrato no modelo de MC, realizamos além dos parâmetros clínicos, a análise histopatológica dos tecidos potencialmente lesados como fígado, baço pulmão e encéfalo (23–26).

Acredita-se que o extrato hidroalcolólico provoque maior injúria no tecido cerebral, corroborados aos achados de hiperchromasia e a vacuolização encontrados no encéfalo. Justificam-se pois os grupos tratados com *D. ambrosioides* apresentaram valores superiores aos demais grupos, sendo que estes achados são sinais indicativos de lesão tecidual. A microscopia, podem ser encontrados presença de neurônios necróticos, com núcleo reduzido de volume e perda da estrutura da cromatina e desaparecimento do nucléolo. Podem ser visualizados, astrócitos gemistocíticos, estes são hipertróficos reativos à lesão, que tendem a formar a cicatriz glial. Em resposta a injúria, as células microgliais perdem os prolongamentos e assumem forma arredondada, constituindo macrófagos com capacidade fagocitária, chamados células grânulo-adiposas.

A vaso oclusão na malária cerebral, reconhecida como um dos mecanismos chaves das lesões cerebrais podem ser compreendida, junto as consequências similares do acidente vascular cerebral isquêmico, em que a obstrução vascular impede o fornecimento de oxigênio e glicose ao tecido adjacente provocando assim a malária cerebral (27–29). Podemos visualizar esse fenômeno nas imagens de tecido cerebral, à vaso oclusão com presença de células inflamatórias e eritrócitos aderidos com redução da integridade da parede vascular. Em nosso estudo foi possível visualizar vasos congestos, com resposta inflamatória tecidual. Nos espaços ventriculares foi possível visualizar aumento de células linfocitárias e eritrócitos sendo uma alteração visualizada em todos grupos, diferindo apenas em sua intensidade de apresentação.

O padrão de hemorragia na malária cerebral não é extenso, com pouco deslocamento de massa, como descreve Strangward¹ et all. (10) em que à menor proporcionalidade de hemorragia na MC comparado com outras patologias. Indicando que, hemorragias no parênquima fazem parte do curso da lesão cerebral, e seu controle pode ser benéfico para o curso sistêmico da condição, porém este achado não está associado como causa predominante de mortalidade durante a malária cerebral experimental (MEC). Quando avaliamos a presença de focos hemorrágicos no pulmão, observa-se que todos os animais do grupo cloroquina e os tratados em baixa dose apresentavam este achado, diferindo do grupo EHB50, que apresentou menor número de animais. Apesar dos efeitos adversos do mastruz ainda serem pouco relatados pela literatura(8), as diferenças para esse achados demonstram um benefício do extrato diante do grupo Cloroquina.

Quando se analisa a presença ou ausência de parasitas, (majoritariamente eritrócitos infectados) existe uma distinção no padrão encontrado anteriormente, em que todos os animais do grupo infectado, apresentaram o achado. O baixo número de animais

com sinais indicativos de presença do parasita também estão nos demais tecidos, sendo assim, apesar da maioria dos achados histopatológicos cerebrais corroborarem para a hipótese do malefício do extrato, a ausência ou baixo número de animais com este achado junto aos bons parâmetros nos outros tecidos, levanta a hipótese que o *D. ambrosioides* possa agir em outras vias de controle da doença. Suspeita-se assim que o desfecho clínico ruim e os parâmetros de agressão cerebral sejam provocados pela lesão direta das substâncias químicas do extrato hidroalcólico ou ocorre um desequilíbrio na passagem das substâncias do extrato entre a barreira hematoencefálica

Uma possível via do *D. ambrosioides* seria ação na resposta inflamatória do hospedeiro. Reconhecesse que o sistema imunológico inato representa a primeira linha de defesa contra patógenos. Células do sistema imune inato, (como macrófagos e células dendríticas), células endoteliais e fibroblastos, expressam PRR, receptores Toll-like (TLR) e receptores do tipo NOD (NLR), que reconhecem PAMPs e DAMPs derivados do hospedeiro. Tal ativação é importante gatilho para o início da cascata de sinalização, levando a codificação de citocinas pró-inflamatórias, como IFN tipo I, IFN- γ , IL-6, IL-12 e TNF (30–32). Dessa forma no curso da infecção pelo *Plasmodium*, a ativação endotelial pode progredir para mudança da permeabilidade vascular e perda da integridade da barreira hematoencefálica e ativar astrócitos e células da glia levando a sintomas de neuroinflamação (32–34).

O edema cerebral e pulmonar são características comuns da malária grave devido ao aumento da permeabilidade capilar que leva à perda de líquido intravascular(23), tais achados são encontrados em nosso modelo, com diferenças entre os grupos. Muscari et all.(35) descreve que independentemente do tamanho da lesão, a morte geralmente não ocorre devido ao déficit neurológico causado diretamente pela isquemia cerebral,

mas pela hipertensão intracraniana motivada pelo inchaço edematoso. Dessa forma o desfecho clínico junto os achados histológicos permitem levantar o maior potencial de agressão do extrato, pois como possível visualizar os grupos EGB5 e EHB50 foram encontradas lesões edematosas mais acentuadas.

Como exposto por Ortolan (36), em seu estudo os murinos infectados com edema pulmonar, apresentaram pior desfecho clínico, com aumento da mortalidade durante a fase exsudativa da síndrome da angústia respiratória aguda (SDRA). Embora não estatisticamente significativos há maior presença de edema pulmonar do infectado vs EBH50 demonstrando assim um possível benefício para a SDRA, corroborando com a hipótese que o extrato tem ação nas vias inflamatórias da MC. Assaad el all.(31) apresenta que o sequestro eritrocitário em modelos de malária cerebral possui como gênese patológica a citoaderência vascular, sendo este um processo importante para o desenvolvimento da lesão tecidual. Suspeita-se que uma das vias de ação protetora do extrato se encontra neste processo de citoaderência pulmonar e também no tecido hepático.

Deroost (25) em seu estudo revelou que a hemozoína (pigmento malárico, um sub-produto do metabolismo intracelular do parasita) quando libertado na corrente sanguínea após a lise eritrocítica é ingerido pelos fagócitos, gerando uma resposta inflamatória. Sendo este um possível mecanismo para a resposta inflamatória sistemêmica em nossos animais. Em nosso estudo, todos os animais apresentaram resposta inflamatória no tecido pulmonar, entretanto ocorreu maior resposta inflamatória em baixas dosagens do extrato e maior valor máximo dos grupos *D. ambrosioides* EHB50, demonstrando um possível efeito inflamatório do extrato neste tecido.

Os perfis celulares encontrados em nosso estudo são condizentes aos encontrados na literatura(25) em que se visualiza linfócitos e macrófagos em maior quantidade. O grupo com maior concentração do extrato pode oferecer um benefício em tecidos não cerebrais. A resposta inflamatória desejada contra um patógeno se baseia no controle dos desfechos desfavoráveis, como os danos teciduais diretos as custas de uma resposta suficiente para o controle do agente agressor e regeneração tecidual. Dessa maneira, acredita-se que nos tecidos pulmonar e hepático o modelo de MC tratado com extrato eleva a atividade inflamatória, porém, com controle de resposta sem lesão tecidual.

A compreensão e a busca para a preservação hepática são importantes no manejo da malária, já que a síntese de membrana e ácido nucleico parasitário, ocorre durante o estágio do fígado, quase três vezes mais do que para estágios de sangue, assim nutrientes são obtidos a partir do hepatócito que abriga a produção de glicogênio e proteína sérica. Conforme a literatura indica (37,38), a vacuolização hepática vista em nossos grupos podem ser considerada pelo perfil de invasão hepática do parasita.

Considera-se que, para ocorrer as lesões hepáticas, são necessárias a presença do parasita acrescido de sua ligação as proteínas presentes na parede celular. Assim a preservação do controle tratado poderia ser justificada pelo efeito antiparasitário da cloroquina, entretanto este mecanismo não pode ser atribuído nos grupos tratados com extrato hidroalcoólico, devido a seu elevado percentual de parasitemia encontrado neste estudo. Pondera-se que os outros mecanismos de proteção como a ligação as proteínas na parede celular, poderiam estar associadas neste efeito benéfico protetivo de lesão hepática, nos animais tratados com *D. ambrosioides*.

Os achados histopatológicos não podem ser analisados considerando apenas uma via de agressão, deve se considerar também toda a complexidade do ciclo de vida parasitário, mecanismos de lesão e resposta do hospedeiro(39). Com isso neste estudo atribuiu-se a lesão hepática, o desequilíbrio da resposta inflamatória, induzindo a apoptose e à lesão direta por agentes químicos externos ou endógenos. Para este último observa-se que o grupo infectado apresenta maior colestase diferindo dos demais grupos, demonstrando assim possíveis benefícios na prevenção ou redução do processo colestático nos tratados com extrato. A colestase também pode ser justificada como conseqüências do processo inflamatório e da infecção direta do parasita, que provoca o acúmulo de bilirrubina dentro e fora dos hepatócitos. As células não são capazes de excretar a bilirrubina, acumulando-a no citoplasma, gera retenção nos canalículos e ductos biliares que também podem ser explicadas em parte pelo aumento do edema intersticial e da tumefação dos hepatócitos.

O estágio de desenvolvimento do parasita é clinicamente silencioso, a resposta imune do hospedeiro para limitar a expansão do parasita durante o desenvolvimento do estágio hepático permanece ainda cercada de hipóteses(40). Neste estudo os achados são condizentes com Hafalla et al. (40), em que quando visualizadas a microscopia hepática, observa-se que do grupo controle infectado apenas um animal apresenta celularidade sugestiva de inflamação, entretanto em EHB50 todos os animais apresentaram processo inflamatório, sugerindo assim que, neste modelo altas concentrações do extrato poderiam induzir uma resposta inflamatória a nível hepático. Corroborando com a hipótese do efeito inflamatório do extrato, sugere-se assim que a resposta inflamatória poderia contribuir para uma menor evolução do quadro, justificada pelos melhores parâmetros de colestase, vacuolização e edema comparado ao grupo infectado.

Ao analisar o antagonismo encontrado entre benefícios do extrato hidroalcoólico nos tecidos pulmonar e hepático e elevada lesão tecidual no sistema nervoso central, suspeita-se que as vias de administração interfiram diretamente nas ações do extrato. Suspeitou-se assim que através da seletividade da barreira hematoencefálica o extrato hidroalcoólico não atravessaria a barreira tornando assim o tecido mais vulnerável aos demais analisados. Outra suspeita é que a lesão provocada na barreira hematoencefálica no modelo de MC levaria a entrada do extrato com maior concentração gerando assim toxicidade ao tecido cerebral. Dessa maneira, utilizamos os testes *in silico*, buscando compreender as vias de melhor absorção do extrato hidroalcoólico associados aos clínicos e histológicos.

Através da análise química realizada pelo grupo(12), verificou-se que o extrato utilizado possui majoritariamente os derivados de Kaempferol e Quercetina. Diferindo na composição do mesmo comparada a outras literaturas, de regiões do Brasil e do mundo. Tendo estes outros, maior quantidade de *α-terpinene*, *p-cymene*, e *ascaridole*, sendo este último em menor quantidade, porém, com grande potencial de uso antibacteriano, anti-fúngico, antiparasitário, anti-inflamatório dentre outros (21,41).

Em nossa análise observa-se que apenas duas substâncias apresentaram baixa CaCO_2 , e todas as demais possuem intermediária absorção. A administração intraperitoneal, foi a via utilizada neste trabalho para o tratamento dos grupos e ao analisar a HIA, sua análise demonstra alto potencial de absorção, demonstrando assim que ambas as vias utilizadas poderiam interferir nas concentrações necessárias para uma melhor ação na MC. Através dos parâmetros clínicos e histopatológicos observa-se que apesar de tais absorções, ocorreu absorção do extrato e que este provocou efeitos sistêmicos nos animais. Entretanto formulações que auxiliem nas taxas de absorção, permitirá uma melhor avaliação dos efeitos biológicos da *D. ambrosioides*,

assim como determinar as melhores vias de administração nos seus distintos efeitos terapêuticos.

Quando analisamos a passagem pela barreira hematoencefálica (BBB), nos valores de referência utilizada pelos desenvolvedores (15–17,19), a maioria apresenta baixa passagem pela barreira. Evidenciando assim que o extrato utilizado possui baixa passagem pela barreira hematoencefálica, contribuindo assim para a hipótese levantada ao longo do estudo, onde observa-se uma contraposição dos achados benéficos do extrato nos tecidos pulmonar e hepático aos lesivos no encéfalo. Entretanto não exclui-se a possibilidade de toxicidade cerebral, pois nos animais tratados com extrato hidroalcoólico são encontrados valores superiores de agressão tecidual associados a um pior desfecho clínico. Dessa maneira acredita-se que a destruição da barreira hematoencefálica inerente à imunopatogênese da MC proporcionaria a entrada química *D. ambrosioides* em concentrações citotóxicas no tecido cerebral.

Em nossa metodologia são similares a extração o preparo do extrato hidroalcoólico da *D. ambrosioides* aos de Gomes (12), em seu trabalho a autora demonstra os benefícios do extrato avaliando a resposta de neutrófilos humanos. Tendo ação eficaz do extrato na capacidade de ativar neutrófilos humanos, porém, sem induzir uma resposta com efeito deletério tecidual. Com isso considerar esta via da imunidade inata ou outras envolvidas na malária cerebral, torna-se promissor o seu uso, com possível uso adjuvante de fármacos, de forma a auxiliar no controle sintomatológico e na proteção dos tecidos envolvidos.

Considerando o desfecho clínico desfavorável neste modelo estudado e os dados histopatológicos encontrados nos diferentes tecidos, o extrato hidroalcoólico de *D.*

ambrosioides poderia promover ação protetiva nos órgãos pulmonar, esplênico e hepático. A agressão encefálica demonstrada nos animais do mesmo grupo levanta hipóteses que levam a necessidade de estudos que compreendam os mecanismos envolvidos destas substâncias neste processo patológico. Estudos de farmacodinâmica e farmacocinética poderiam contribuir para melhor absorção e ação do extrato nos diferentes tecidos. Tal compreensão e estruturação poderá fornecer concentrações necessárias para ação benéfica do extrato, minimizando os possíveis efeitos tóxico e indesejados.

Conclusão

Nesse estudo o uso do extrato hidroalcoólico *D. ambrosioides* demonstrou uma ação desfavorável quanto o desfecho clínico neurológico dos animais, tornando-os mais vulneráveis e passíveis a mortalidade. Entretanto através da análise histopatológica podemos observar benefícios auxiliares nos tecidos pulmonar, hepático, esplênico e com menor presença do parasita e focos hemorrágicos no tecido cerebral, mesmo as custas de evidente lesão tecidual encefálico. Demonstrando assim a importância de novos estudos para compreender as ações do *D. ambrosioides* diante dos mecanismos que poderiam influenciar nos possíveis benefícios na malária cerebral.

Declaração de ausência de conflitos de interesse

Declaro que não há conflitos de interesses entre o autor deste artigo intitulado: “Análise do potencial terapêutico do extrato hidroalcoólico da *Dysphania ambrosioides* L. em um modelo de malária cerebral”.

Financiamento

Este trabalho recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA..(42)

Referências

1. World malaria report 2018. 2018.
2. Carroll RW, Wainwright MS, Kim K-Y, Kidambi T, Gómez ND, Taylor T, et al. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS One*. 2010;5(10):e13124.
3. Go D, Carroll RW, Wainwright MS, Kim K, Kidambi T, Taylor T, et al. A Rapid Murine Coma and Behavior Scale for Quantitative Assessment of Murine Cerebral Malaria. 2010;5(10):1–12.
4. Hearn J, Rayment N, Landon DN, Katz DR, Souza JBDE. Immunopathology of Cerebral Malaria : Morphological Evidence of Parasite Sequestration in Murine Brain Microvasculature. 2000;68(9):5364–76.
5. Lacerda-queiroz N. Immunopatogênese da malária cerebral Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Rev Bras Neurol*. 2008;44(1):13–9.
6. Riggle BA, Sinharay S, Schreiber-stainthorp W, Munasinghe JP, Maric D, Hammoud DA. MRI demonstrates glutamine antagonist-mediated reversal of cerebral malaria pathology in mice. 2018;1–10.
7. Craig AG, Grau GE, Janse C, Kazura JW, Milner D, Barnwell JW, et al. The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog*. 2012;8(2).
8. Sá RD, Alberto L, Soares L, Randau KP. Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L .: estado da arte. 2015;36(2):267–76.
9. Ferreira LG, Oliva G, Andricopulo AD. From Medicinal Chemistry to Human Health : Current Approaches to Drug Discovery for Cancer and Neglected Tropical Diseases. 2018;90:645–61.

10. Strangward P, Haley MJ, Shaw TN, Schwartz JM, Greig R, Mironov A, et al. A quantitative brain map of experimental cerebral malaria pathology. Vol. 13, PLoS Pathogens. 2017. 1–37 p.
11. Fernandes D, Fernandes FR, Silva A, Maria F. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE ATIVIDADE GIARDICIDA DE *Chenopodium ambrosioides* L . E A PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS NA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS. 2011;155–65.
12. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde EFEITO DO EXTRATO DE *Dysphania ambrosioides* (L) NA EFEITO DO EXTRATO DE *Dysphania ambrosioides* (L) NA São Luís. 2018;(L).
13. Saldanha LL, Vilegas W, Dokkedal AL. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. 2013;8402–16.
14. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2019 update : improved access to chemical data. 2019;47(October 2018):1102–9.
15. Chen C, Yang J. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic. 2005;26(4):500–12.
16. Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. 2000;10:195–204.
17. Zhao YH, Le J, Abraham MH, Hersey A, Eddershaw PJ, Luscombe CN, et al. Evaluation of Human Intestinal Absorption Data and Subsequent Derivation of a Quantitative Structure ± Activity Relationship (QSAR) with the Abraham

- Descriptors. *J Pharm Sci* [Internet]. 2001;90(6):749–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.1031>
18. Bemis GW, Murcko MA. Designing Libraries with CNS Activity. 1999;4942–51.
 19. Lobell M. Recent Advances in the Prediction of Blood – Brain Partitioning from Molecular Structure. 2003;92(2):360–70.
 20. Cysne DN, Fortes TS, Reis AS, de Paulo Ribeiro B, dos Santos Ferreira A, do Amaral FMM, et al. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *Parasitol Res* [Internet]. 2016;115(11):4327–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5216-x>
 21. Reyes-Becerril M, Angulo C, Sanchez V, Vázquez-Martínez J, López MG. Antioxidant, intestinal immune status and anti-inflammatory potential of *Chenopodium ambrosioides* L. in fish: In vitro and in vivo studies. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2019;86(November 2018):420–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.059>
 22. Pereira NLF, Aquino PEA, Silva MR, Nascimento EM, Grangeiro ARS, Oliveira CDM, et al. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. . *Rev Fitos*. 2015;9(2):101–12.
 23. Cariaco Y, Lima WR, Sousa R, Alencar L, Nascimento C, Briceño MP, et al. Ethanolic extract of the fungus *Trichoderma stromaticum* decreases inflammation and ameliorates experimental cerebral malaria in. 2018;(January):1–15.
 24. DING Y, XU W, ZHOU T, LIU T, ZHENG H, FU Y. Establishment of a murine model of cerebral malaria in KunMing mice infected with *Plasmodium berghei*

- ANKA . Parasitology. 2016;143(12):1672–80.
25. Deroost K, Tyberghein A, Lays N, Noppen S, Schwarzer E, Vanstreels E, et al. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(5):589–600.
 26. Liehl P, Zuzarte-Luís V, Chan J, Zillinger T, Baptista F, Carapau D, et al. Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat Med*. 2014;20(1):47–53.
 27. Verkhatsky A, Zorec R, Rodriguez JJ, Parpura V. Pathobiology of Neurodegeneration: the Role for Astroglia. *Opera medica Physiol* [Internet]. 2016;1(i):13–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27308639><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4905715>
 28. Wassmer SC, Grau GER. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *Int J Parasitol*. 2017;47(2–3):145–52.
 29. Lennartz F, Adams Y, Bengtsson A, Hviid L, Higgins MK, Jensen ATR, et al. Structure-Guided Identification of a Family of Dual Receptor-Binding PfEMP1 that Is Associated with Article Structure-Guided Identification of a Family of Dual Receptor-Binding PfEMP1 that Is Associated with Cerebral Malaria. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2017;21(3):403–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.009>
 30. Hunt NH, Golenser J, Chan-ling T, Parekh S, Rae C, Potter S, et al. Immunopathogenesis of cerebral malaria. 2006;36:569–82.

31. El-Assaad F, Wheway J, Mitchell AJ, Lou J, Hunt NH, Combes V, et al. Cytoadherence of Plasmodium berghei-Infected Red Blood Cells to Murine Brain and Lung Microvascular Endothelial Cells In Vitro . Infect Immun. 2013;81(11):3984–91.
32. Dunst J, Kamena F, Matuschewski K. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. 2017;7(July).
33. Combes V, El-Assaad F, Faille D, Jambou R, Hunt NH, Grau GER. Microvesiculation and cell interactions at the brain-endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. Prog Neurobiol. 2010;91(2):140–51.
34. Howland SW, Claser C, Poh CM, Gun SY, Rénia L. Pathogenic CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. Semin Immunopathol. 2015;37(3):221–31.
35. Muscari A, Faccioli L, Lega MV, Lorusso A, Trossello MP, Puddu GM, et al. Predicting cerebral edema in ischemic stroke patients. Neurol Sci. 2019;40(4):745–52.
36. Ortolan LS, Sercundes MK, Barboza R, Debone D, Murillo O, Hagen SCF, et al. Predictive Criteria to Study the Pathogenesis of Malaria-Associated ALI/ARDS in Mice. Mediators Inflamm. 2015;2014.
37. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. Cell [Internet]. 2016;167(3):610–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
38. Risco-Castillo V, Topçu S, Marinach C, Manzoni G, Bigorgne AE, Briquet S, et al. Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles. Cell Host Microbe. 2015;18(5):593–603.

39. Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van Rooijen N, Medvinsky A, et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med*. 2013;210(5):905–15.
40. Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev*. 2011;240(1):297–316.
41. Trivellatograssi L, Malheiros A, Meyre-Silva C, Da Silva Buss Z, Monguilhott ED, Fröde TS, et al. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(1):127–38.
42. Em PDEP, Farmacêuticas C. Desenvolvimento de modelos de QSAR e análise quimioinformática da sensibilização e permeabilidade da pele Goiânia
Desenvolvimento de modelos de QSAR e análise quimioinformática da sensibilização e permeabilidade da pele Goiânia. 2014;