UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA INFECÇÃO MALÁRICA POR *P. gallinaceum*

KARLA CAROLINE MARQUES DE OLIVEIRA

BELÉM
2013

KARLA CAROLINE MARQUES DE OLIVEIRA

PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA INFECÇÃO MALÁRICA POR *P. gallinaceum*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, área de concentração Biologia Celular, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Co-orientadora: Prof. Dra. Barbarella de Matos Macchi

Belém

2013

KARLA CAROLINE MARQUES DE OLIVEIRA

PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA INFECÇÃO MALÁRICA POR *P. gallinaceum*

Outubro de 2013

Banca Avaliadora:

Dr. José Luiz Martins do Nascimento (Orientador)
Dra. Barbarella de Matos Macchi (Co-orientadora)

Dr. Moisés Hamoy
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA
(Membro Titular da Banca Avaliadora)

Dra. Gilmara Tavares Bastos
Instituto de Ciências Biológicas-UFPA
(Membro Titular da Banca Avaliadora)

Dra. Maria Elena Crespo López
Instituto de Ciências Biológicas
(Membro Suplente da banca avaliadora)

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

Aos meus pais e irmã que sempre estiveram ao meu lado como amigos e conselheiros. Sem vocês eu não seria quem eu sou hoje. Vocês são a base da minha vida.

Àquelas pessoas que de alguma forma depositam sua fé na ciência tendo esperanças que um dia ela servirá a todos igualitariamente.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus,** pela força de prosseguir meu crescimento pessoal, profissional e científico e pelas pessoas que engrandeceram cada passo desta fase da minha jornada.

A minha mamusca (mãe) **Sônia** pela paciência, pelo suporte emocional, pelos puxões de orelha, pelo amor incondicional e por ter estado comigo em cada passo que eu dei em minha vida me falando por onde caminhar e continuando a falar por mais que eu desviasse o caminho de vez em quando. Eu sei que não demonstro meu imenso amor por ela com frequência, mas gostaria de deixar registrado que sem minha mãe eu não seria nada e não estaria tendo tantas oportunidades de viver.

Ao meu papito (pai) **Luiz Carlos** pelo amor, carinho, pelos momentos engraçados nos poucos almoços nos fins de semana. Obrigada pelas discussões bestas que geraram muitas risadas na cozinha de casa. Só sabe o valor da palavra pai quando de fato você convive, aprende e é amada por uma pessoa que realmente se propõe a sê-lo. Tenho certeza que o senhor é uma parte essencial para minha vida.

A minha irmã **Louize** pelo amor, carinho, puxões de orelha, birras, irritações, brincadeiras e reflexões que me ajudaram nos momentos mais difíceis e nos mais fáceis também. Obrigada pela compreensão nos meus momentos de estresse, pelos segredos compartilhados, pelas fofocas discutidas durante a madrugada e por me escutar. Te amo muito Loloca!

Aos meus avôs (**Waldemar e Neno**) e avós (**Georgina e Olinda** *(in memoriam)*) por participarem da minha vida e sempre me darem suporte onde quer que estejam. Obrigada pelo amor inesgotável e carinho ímpar.

Aos meus primos, tios e sobrinhos!! Vocês são meus segundos irmãos, pais e filhos postiços. Obrigada por me acompanharem em cada passo que eu dei.

Ao meu orientador, professor **José Luiz Martins do Nascimento**. Obrigada pela primeira oportunidade de desenvolver minha vida científica, por confiar em mim para desenvolver este plano de trabalho e por ter engrandecido tanto meu conhecimento científico quanto meu conhecimento poético e literário.

A minha co-orientadora **Barbarella de Matos Macchi** por ter acreditado em mim e por ter sido meu alicerce durante o desenvolvimento desta dissertação e para

tanto, muitas vezes abdicando de momentos com sua família. Realmente não tenho palavras pra agradecer seu empenho e dedicação na evolução da minha vida profissional e pessoal. A gente só reconhece um amigo quando passamos por tantas dificuldades e problemas juntos e perseveramos e vencemos juntos. Muito obrigada mesmo! Minha eterna companhia nos pintocídios da vida!

A professora **Gilmara Bastos** pelos anos de amizade e pela imensa força dada em todos meus passos acadêmicos e pelos puxões de orelha que sempre me fortificaram. Muito obrigada!!

Não tinha como esquecer a **Lulu pintadinha (Luisa)** e o **Igor Andrade**. Muito obrigada pelos fins de semana em que vocês me emprestavam a Barbarella ou iam para o Laboratório nos ajudar nos experimentos. Vocês são uma família linda! Sou extremamente grata por tudo.

Ao Professor **Renato DaMatta**, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, por me receber durante quatro meses em Campos dos Goytacazes compartilhando um pouco dos seus conhecimentos, por sua dedicação para o desenvolvimento de parte dos meus experimentos e por me fornecer valiosas dicas para o desenvolvimento da minha dissertação.

Ao Professor **Claudio Retamal**, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, por me ensinar com tanta dedicação e paciência e por ter me recebido de braços abertos mesmo não me conhecendo.

A **Neidiane Ramos** pela paciência, pela amizade e pelos diários “vamos tomar um café?” que alegravam meu dia por mais que tudo estivesse dando errado.

A **Dayane Dias**, minha mestranda, pela confiança, pelas conversas de apoio, pelo ombro amigo nos momentos de choro e obrigado pelos convites que eu raramente aceitava, mas que eu sempre ficava feliz por ser lembrada. Obrigada!

A **Erica de Tássia**, pelas conversas, pelas confidências, pelo apoio em momentos onde eu já não tinha esperança e por rir das minhas piadas. Obrigada Eriqueta! O orgulho de Cândido Mendes!

Ao **Luís Antônio Maués** pelas conversar úteis e fúteis nos momentos de descontração e concentração. Obrigada pelas dicas imprescindíveis no decorrer desses anos de convivência.

Um mestrado não é feito só por uma pessoa, ele é uma equipe e por isso gostaria de agradecer a **Patrícia Gonçalves** e ao **Robson Nascimento**, pelo apoio

técnico, pelas brincadeiras, pelas dicas musicais e por terem sido muitas vezes meu braço direito e esquerdo. Vocês são ICs e pessoas sensacionais.

Gostaria de agradecer alunos do laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, **Alda**, **Lillian**, **Vanessa** e **Paulo** pelo apoio e companhia.

Gostaria de agradecer aos alunos da minha segunda casa no ICB , o Laboratório de Neuroinflamação, em especial a **Gisely**, **Maria Elizabeth**, **Amanda Mota**, **Amanda Pâmela**, **Gabriel**, **Marcos**, **Maurício**, **Társis**, **Roberta** e **Anderson**. Foi ótimo desfrutar da companhia de vocês nos momentos felizes e tensos. O ser humano não é nada sem família e amigos e por isso fico imensamente feliz de tê-los como companheiros científicos e de vida.

Glenda e **Carlinha**, obrigada por entenderem a minha ausência na maioria das vezes. Fico imensamente feliz quando penso que há praticamente nove anos começamos a nossa amizade. Da adolescência à vida adulta e se Deus quiser em outras fases da vida. Amo vocês duas e sei que sempre torceram por mim.

Não tenho como esquecer meus eternos companheiros de vida acadêmica e farrista, **Breno**, **Ivy**, **Laine**, **Pati** e **Yas**. Obrigada pelos quatro anos maravilhosos vividos na Biomedicina e fora dela, obrigada por lembrarem de mim e por terem estado ao meu lado durante, a graduação, mestrado e certamente por mais um tempinho indeterminado. Amo vocês. “Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado dos amigos, com certeza vai mais longe”.

Para ser amigo, amigo mesmo não precisa necessariamente estar fisicamente perto se a amizade for forte basta poucos momentos para saber que é uma amizade forte e duradoura, diante disso gostaria de deixar meu mais profundo agradecimento a **Leila Sawada** (Leiloca) e a **Claudia Bobadilla Chávez** (Boba). Vocês podem estar no Japão ou no Peru, mas sinto o imenso apoio de vocês em cada passo profissional que eu dou. A saudade é imensa, mas sei que um dia vamos comemorar nossas vitórias. Voltem logo suas cabeçudas!

Todo mundo diz que só se reconhece um amigo com o tempo, mas acho que há exceções, por isso gostaria de agradecer a **Camila Ventura**, **Aline Ventura** e **Fernanda Souza** por terem me recebido tão bem durante quatro meses em Campos dos Goytacazes. Obrigada por permitirem que eu fizesse parte da família de vocês. Não sei se conseguiria sem nossas conversas malucas, idas ao Super Bom, desfiles na sala, pipocas na madrugada, saídas pelo plano B e suporte incondicional que vocês sempre me deram.

Por quase último, mas de maneira nenhuma menos importante, gostaria de agradecer a todos os membros da **Trupe da Pro.Cura**, em especial aos meus queridos **Phillipe Sendas (Patchouli)**, **Vitor Nina (Florindo)**, **Bel Passinho (Beribela Passarinho)**, **Thiago Paladino (Queixo)**, **Wanderson Carvalho (Ninho)** e **Bruno Passos (Preguiço)**. Comecei o meu mestrado praticamente ao mesmo tempo em que entrei para Trupe e desde então vocês têm sido amigos fenomenais. Obrigada pelas sextas de cinema e discussões, sábados de ensaios, intervenções e comemorações e domingos de entradas ou praça. Obrigada por compartilharem a arte de vocês comigo e por tanto empenho, estardalhaço e luta por uma saúde pública renovada e democrática onde a arte seja um dos motores centrais da verdadeira saúde e da real ciência. Vocês moram no meu Nariz! Evoé! =O).

Gostaria de agradecer a **CAPES**, **UFPA**, **CNPq** e **FAPESPA** pelo suporte financeiro e material durante o desenvolvimento desta dissertação.

RESUMO

Malária é uma das mais incidentes doenças infecciosas do mundo. Na Amazônia existem muitos casos de malária causados principalmente por duas espécies de protozoários, o *Plasmodium* vivax e o *Plasmodium falciparum*, sendo este último responsável pela maioria dos casos de malária grave, que geralmente levam a morte devido ao acometimento de múltiplos órgãos, como o cérebro. Um dos mediadores químicos amplamente estudados nessa patogênese é o Óxido Nítrico (NO), o qual apresenta papel controverso. Atualmente duas hipóteses principais são apontadas como potencializadoras na patogênese. Uma, que a MC é causa da superprodução de NO, produzido pela Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS), após um quadro de hipóxia. Outra, diz que a MC é a causa da resposta exacerbada do sistema imunológico com produção de NO pela Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS), presente nos macrófagos quando ativados pro determinantes antigênicos. Devido grande relevância da doença e dificuldade em enteder a patologia, modelos experimentais têm sido estabelecidos com a finalidade de esclarecer vias potenciais da evolução para MC, dentre eles o modelo de malária aviária causada pelo *Plasmodium gallinaceum*. Pouco se sabe sobre o seu papel do NO em modelos de malária aviária, principalmente devido inexistência de marcadores específicos para avaliar expressão das enzimas de síntese. Diante disso é importante estabelecer protocolos de purificação da iNOS de galinhas para a produção de um possível marcador. Para tanto se faz necessário investigar o papel do NO durante a malária aviária, em modelo experimental *in vivo* e *in vitro*, com linhagens de macrófagos de galinha HD11. Animais infectados com *P. gallinaceum* tratados com aminoguanidina (AG), um inibidor da produção de NO, tiveram maior sobrevida, além de menores níveis de nitrito no plasma e em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico, sugerindo a inibição da iNOS. Nos experimentos *in vitro*, células HD11 tratadas com LPS mostraram produção aumentada de NO, inferindo aumento na expressão e atividade da iNOS. Na separação proteica, observamos padrões diferentes que podem ser associados a uma elevada expressão da iNOS nos macrófagos ativados com LPS. Esse estudo proporcionará o melhor entendimento do modelo de malária aviária em galinhas, incluindo a cerebral, e envolvimento do sistema nitrérgico em galinhas infectadas com *P. gallinaceum*.

Palavras-chave: malária, *Plasmodium gallinaceum*, óxido nítrico, óxido nítrico sintase, aminoguanidina, macrófagos HD11

ABSTRACT

Malaria is a severe infectious disease caused by parasites of the genus *Plasmodium* that infect different types of vertebrate's hosts and is responsible for a huge number of deaths. The severe Malaria can lead to death and involves different pathophysiological signs as well as anemia and inflammation. Experimental models are necessary to improve the knowledge about mechanisms involved at the pathogenesis of the disease and the developing new protocols of treatment. Chickens infected with *P. gallinaceum* are a good model of malaria due to phylogenetic relatedness with human *Plasmodium* and because both species presents common clinical signs as cerebral malaria. The Nitric Oxide (NO) is an important effector molecule, but little is known about their role in malaria on chickens, meanly due to the lack of specific markers to evidence the NO production in this model. It is known that chickens infected with *P. gallinaceum* has a high mortality and causes an overproduction of nitrite by macrophages. The animals, when treated with aminoguanidine (AG), an inhibitor of inducible oxide nitric synthase (iNOS), showed a higher level of parasitemia. However, the rate of survivor was superior, beyond the clinical manifestations, as milder anemia. It is necessary to achieve a better comprehension about physiological aspects of avian malaria with the inhibition of NO's production by the AG. In the context , the present study aims to investigate NOS activity and the role of NO during the avian malaria infection, with in vivo models, using *P. gallinaceum* as pathological agent , and in vitro with chicken's macrophage of HD11 strain. This research will give a better understanding of avian malaria in chickens, including cerebral, and the involvement of nitrergic system in infected chickens.

Key-words: malaria, *Plasmodium gallinaceum*, nitric oxide, nitric oxide synthase, aminoguanidine, HD11 macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial do *P. gallinaceum* 2
Figura 2: Ciclo de Vida do Protozoário *Plasmodium sp* 4
Figura 3: Filograma baseado na análise da proteína circunsporozoíta ... 8
Fidura 4A: Citoaderência de eritrócitos infectados e não infectados a células endoteliais de vasos da microcirculação cerebral 11
Figura 4B: Hipótese para o mecanismo da patogênese da Malária Cerebral 12
Figura 5: Biossíntese do NO 14
Figura 6: Taxa de sobrevida de animais infectados com *Plasmodium gallinaceum* tratados ou não com aminoguanidina 30
Figura 7: Níveis de nitrito no plasma de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum*, tratados ou não com aminoguanidina 31
Figura 8: Produção de óxido nítrico por macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* 33
Figura 9: Produção de Óxido Nítrico em células HD11 35
Figura 10: Gel de eletroforese SDS/PAGE 10% para células HD11 tratadas ou não com LPS 36
Figura 11: Marcação para NADPH-diaforase em gel de eletroforese 38
Figura 12: Gel de eletroforese em 2D para células tratadas ou nãos com LPS 39
Figura 13: Análise de gel bidimensional SDS/PAGE 10% de macrófagos HD11 estimuladas ou não com LPS 41

LISTA DE ABREVIATURAS

AG: Aminoguanidina
APCs: Células Apresentadoras de Antígenos
BH4: Tetrahidrobiopterina
CaM: Calmodulina
CD14: Cluster de Diferenciação 14
Células NK: Células Natural Killer
COX-2: Ciclooxigenase-2
CS: Proteína Circumesporozoíta
eNOS: Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FAD: Dinucleotídeo de Flavina e Adenina
FMN: Flavina mononucleotídeo
IL-12: Interleucina-12
ILs: Interleucinas
INF-γ: Interferon-gamma
iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzida
LBP: Proteína Ligadora de LPS
L-NAME: L-Nitro-Arginina Metil Ester
L-NARG: L-Nitroarginina
LPS: Lipopolissacarídeo
MAL: Proteína Adaptadora tipo MyD88
MC: Malária Cerebral
MyD88: Proteína Adaptadora
NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
NF-κB: Fator Nuclear Kappa B
nNOS: Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO: Óxido Nítrico
NOS: Óxido Nítrico Sintase
PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos
SNC: Sistema Nervoso Central
TIRAP: Proteína Adaptadora que contêm domínios TIR
TLR-4: Receptor Toll-like 4
TNF– α: Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. MALÁRIA: CONSIDERAÇÕES GERAIS 1
1.1.1. Ciclo biológico do gênero *Plasmodium* 3
1.1.2. Manifestações clínicas 5
1.1.3. Modelos experimentais 6
1.2. MALÁRIA AVIÁRIA: CONSIDERAÇÕES GERAIS 6
1.3. MALÁRIA CEREBRAL 10
1.4. ÓXIDO NÍTRICO 12
1.4.1. Formação do Óxido Nítrico 12
1.4.2. Óxido Nítrico e malária 13
1.4.3. Óxido nítrico e malária aviária 16
1.5. SISTEMA IMUNOLÓGICO: ASPECTOS GERAIS 17
1.5.1. Imunidade inata e macrófagos..... 18
1.6. UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNA PURIFICADA 19
2. OBJETIVOS 22
2.1. OBJETIVO GERAL 22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22
3. MATERAIS E MÉTODOS 23
3.1. ANIMAIS E CEPA 23
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS 23
3.3. TRATAMENTO COM AMINOGUANIDINA (AG) E INFECÇÃO COM *P.gallinaceum* 23
3.4. DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA 24
3.5. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO PLASMA 24
3.6. CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO 25
3.7. PRODUÇÃO DE NITRITO EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO E EM CÉLULAS HD11 25
3.8. LINHAGEM CELULAR DE MACRÓFAGOS DE GALINHA (HD11) 26
3.9. ESTIMULAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS HD11 26
3.10. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS 26
3.11. SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE 27
3.12. ENSAIOS ELETROFORÉTICOS 28
3.12.1. Géis Unidimensionais 28
3.12.2. Géis Bidimensionais 28
3.13. BIOQUIMICA DA NADPH-DIAFORASE EM GEL 28
3.13.1. Detecção da atividade no gel 28
3.13.2. Quantificação da atividade no gel 28
3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA 29
4. RESULTADOS 30

4.1. SOBREVIDA E PARASITEMIA 30
4.2. NÍVEIS DE NITRITO/NITRATO NO PLASMA DE ANIMAIS INFECTADOS COM *P. gallinaceum* TRATADOS OU NÃO COM AMINOGUANIDINA 30
4.3. NÍVEIS DE NITRITO EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE ANIMAIS INFECTADOS COM *P. gallinaceum* TRATADOS OU NÃO COM AMINOGUANIDINA 33
4.4. NÍVEIS DE NITRITO EM CÉLULAS HD11 ESTIMULADAS OU NÃO COM LPS 35
4.5. PROTEÍNAS APÓS ELETROFORESE EM GEL SDS/PAGE 1D 35
4.6. ATIVIDADE DA NADPH-DIAFORASE EM GEL NATIVO/PAGE 38
4.7. PROTEÍNAS APÓS ELETROFORESE EM GEL SDS/PAGE 2D 38
5. DISCUSSÃO 43
6. CONCLUSÃO 50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

1. INTRODUÇÃO

1.1. MALÁRIA: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Malária é uma das mais importantes doenças infecciosas do mundo, com uma incidência em cerca de 90 países, e causa 250-500 milhões de casos clínicos e, atualmente estima-se que ocorram em torno de 1-3 milhões de mortes por ano, sendo a maioria dos casos em crianças menores de cinco anos (SNOW *et al*, 2005; OMS, 2011). Causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida ao homem pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles*, é caracterizada pela tríade: febre, calafrio e cefaléia (CLARK *et al.*, 1997; TAYLOR-ROBINSON, 2000; de SOUZA & RILEY, 2002). Atualmente, aproximadamente 200 espécies de *Plasmodium* já foram identificadas, e são comuns a muitas espécies de vertebrados, como aves, répteis e mamíferos, sendo transmitidas por vetores hematófagos (SCHALL, 1990; KRETTLI, 1994; VALKIUNAS, 2005; SLATER, 2005).

Para a doença em humanos, eram reconhecidas apenas quatro espécies: *Plasmodium* (*Plasmodium*) *vivax* (GRASSI & FELETTI, 1890), *Plasmodium* (*Laverania*) *falciparum* (WELCH, 1897), *Plasmodium* (*Plasmodium*) *malariae* (LAVERAN, 1881; GRASSI & FELETTI, 1890) e *Plasmodium* (*Plasmodium*) *ovale* (STEPHENS, 1922) (BRUCE-CHWATT, 1980). Destas, apenas o *P. ovale* não é encontrado no Brasil. Na Amazônia existem muitos casos de malária, causados principalmente por duas espécies *P. vivax*, responsável pela maioria dos casos de malária na região, e *P. falciparum*, responsável pelos casos de malária grave que levam à morte, devido ao acometimento de múltiplos órgãos, dentre eles o cérebro, e está amplamente distribuído em vários países (Figura 1) (SNOW *et al.*, 2005; COBAN *et al.*, 2006; LEPENIES *et al .,* 2008; OMS, 2011). Recentemente, foi descrito infecção em humanos por *P. knowlesi*, antes descrito apenas como parasito de primatas não-humano (TA TANG *et al.*, 2010).

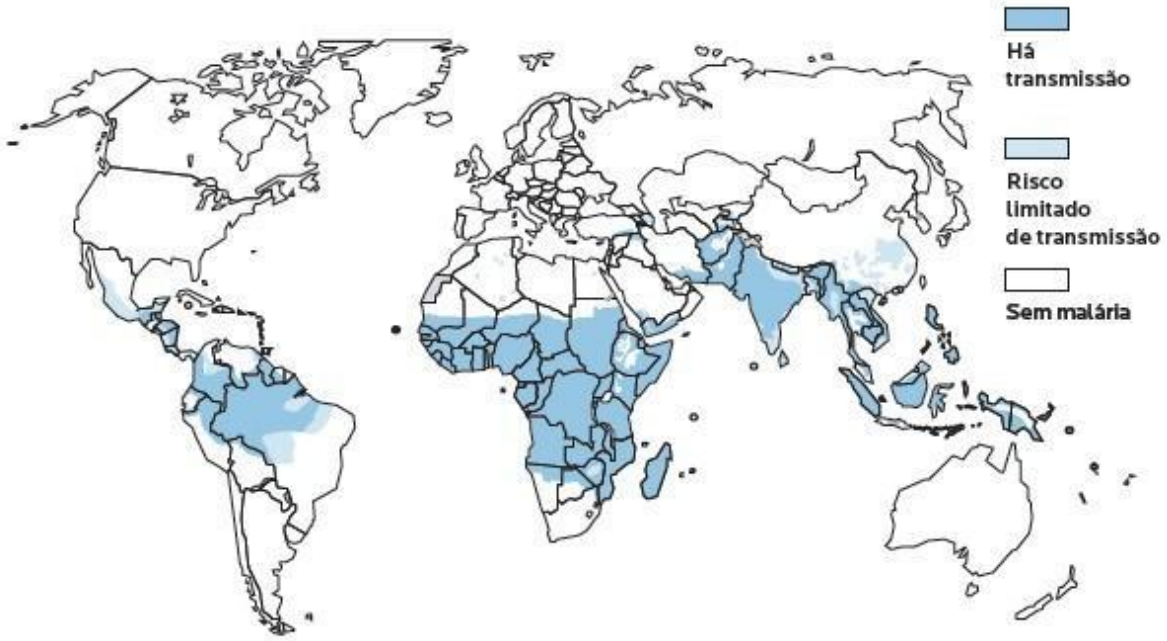

Figura 1: Distribuição mundial do *Plasmodium falciparum* em áreas de risco. Áreas: azul claro, mesoendêmica (áreas onde a prevalência está entre 11% e 50%); azul escuro, hiperendêmica e holoendêmica (áreas onde a prevalência é >50%) e branco, área fora dos limites de transmissão, onde a densidade populacional é bem menor. Fonte: Dados da OMS (2009).

Entre as demais espécies, destacamos o *P. simium* e o *P. brasilianum* como parasitos de primatas não humanos, morfologicamente semelhantes aos *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente. Em outros vertebrados, podemos destacar as espécies *P. berghei* e *P. chabaudi*, responsáveis pela infecção em camundongos (DE SOUZA & RILEY, 2002; SLATER, 2005), e *P. juxtanucleare* e *P. gallinaceum*, responsáveis pela infecção em galinhas (GARNHAN, 1966; SLATER, 2005).

1.1.1. Ciclo biológico do gênero *Plasmodium*

A malária é causada pelo protozoário plasmódio e sua patologia está associada a vários fatores, dentre eles as diferentes espécies e formas do parasito durante seu ciclo evolutivo (LOU *et al.,* 2001). O ciclo do *Plasmodium* é do tipo heteroexenico, com dois hospedeiros – um artrópode (hospedeiro definitivo) e um vertebrado (hospedeiro intermediário) (Figura 2). No geral, a infecção malárica ocorre em dois estágios distintos: (i) o estágio inicial no tecido, onde através da picada do mosquito infectado, formas infectantes do parasito (esporozoítos) entram na corrente sanguínea do hospedeiro, invadem hepatócitos, amadurecem e emergem como merozoítos. Esse processo ocorre entre 8 a 10 dias, período onde a infecção é assintomática. (ii) Os merozoítos, liberados pelos hepatócitos, entram na circulação e invadem os eritrócitos, se multiplicam e invadem outros eritrócitos. Esse processo ocorre em 48 h, e gera um crescimento exponencial do parasito com a destruição maciça de eritrócitos. É ainda nesta etapa que se verifica os sinais clínicos da malária, devido ruptura dos eritrócitos e liberação de antígenos do parasito (GOWDA *et al.,* 2007). O ciclo no mosquito inicia-se quando o mesmo faz o repasto sanguíneo em um indivíduo portador das formas sexuadas do parasito (Figura 2) (PÓVOA *et al.* 2000).

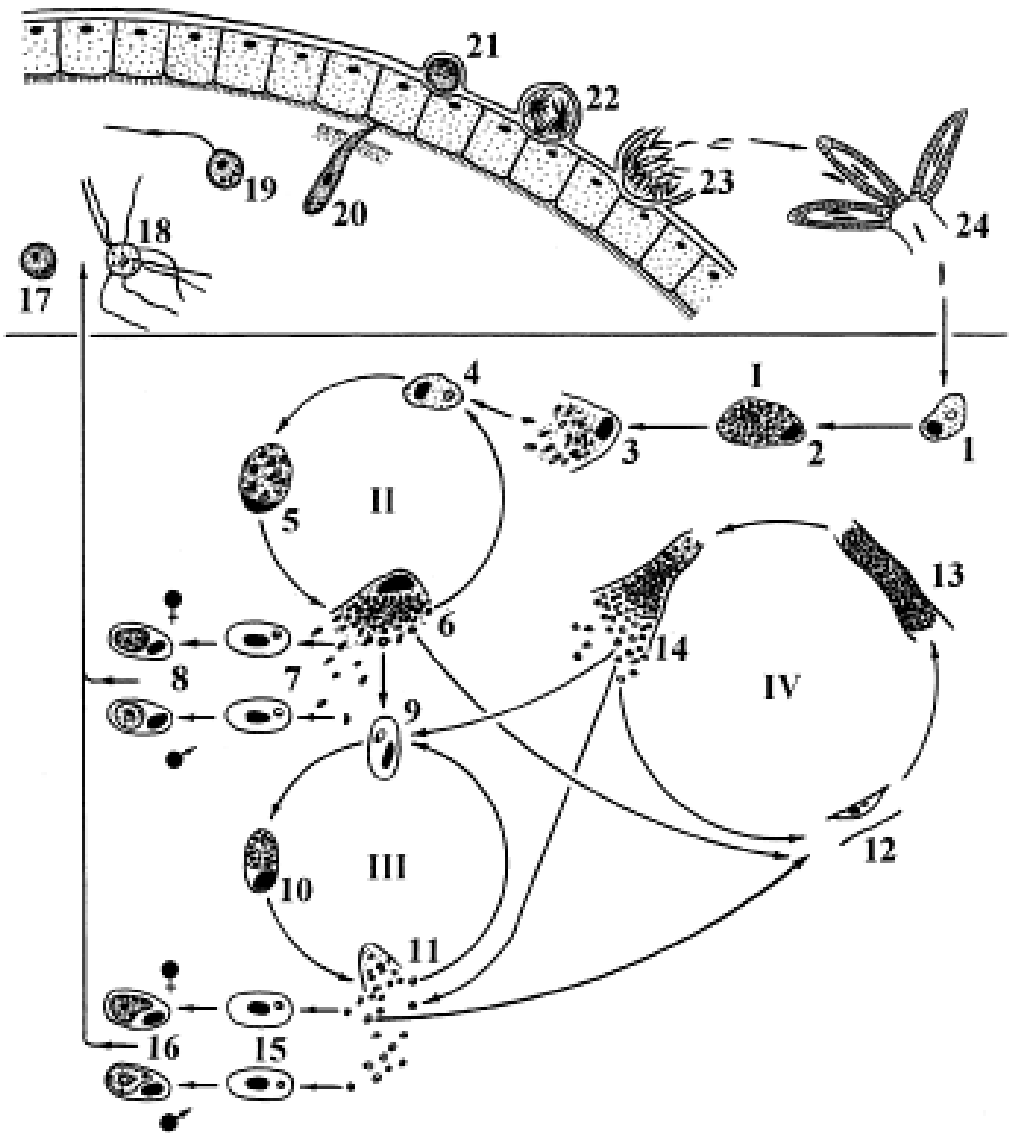

Figura 2: Representação do ciclo de vida do parasito da malária em aves (*Plasmodium relictum* como exemplo): parte superior, no vetor; parte inferior na ave: I,II – Merogonia exoeritrocítica primária; III – Merogonia eritrocítica; IV – Merogonia exoeritrocítica secundária; 1 – Esporozoíta nas células reticuloendoteliais; 2,3 – Criptozoítas; 4 – Merozoíta em macrófago; 5,6 – Metacriptozoíta; 7 – Merozoíta em eritrócito; 8 – Gametócito; 9 – Merozoíta em eritrócito; 10, 11 – Merontes eritrocíticos; 12; Merozoítos nas células endoteliais dos capilares; 13, 14 – Fanerozoíta; 15 – Merozoítas nos eritrócios; 16 – Gametócitos; 17 – Macrogametas; 18 – Exflagelação; 19 – Fertilização de macrogametas; 20 – Oocineto penetrando a membrana periférica; 21 – Oocisto jovem; 22, 23 – Esporogonia; 24 – Esporozoíta na glândula salivar do vetor. (VALKÜNAS, 2005)

1.1.2. Manifestações clínicas

As principais manifestações clínico-patológicas relacionadas à doença estão associadas ao ciclo biológico do plasmódio e surgem no início do ciclo eritrocítico. Os achados clínicos e patológicos são consequências de processos resultantes da invasão e ruptura da hemácia ou da obstrução de vasos capilares profundos. A patogenia da malária é multifatorial estando relacionada com fatores envolvidos entre o hospedeiro e o parasito. Dentre estes fatores, destacamos como desencadeadores dos processos fisiopatológicos a destruição de eritrócitos, causada por esquizogonia, com consequente liberação de parasito e material eritrocitário na circulação. Ocorre também um aumento na expressão antigênica nos eritrócitos. Estes eventos produzem uma resposta imunológica exacerbada do hospedeiro (HEDDINI, 2002; SHINGADIA & SHULMAN, 2000; CLARK & COWDEN, 2003). No entanto, passou a ser considerada como resultado da produção de citocinas pro-inflamatórias (Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α), interleucinas 1 e 6, linfotoxinas e Interferon γ (INF-γ)) após o início de estudos que proporcionaram melhor conhecimento da participação das citocinas na resposta imune. A liberação destas citocinas é disparada pela infecção do parasito ou por toxinas parasitárias liberadas com a ruptura dos esquizontes, que causam o quadro característico da doença (CLARK *et al*, 1997; DANIEL-RIBEIRO & FERREIRA-DA-CRUZ, 2000; WASSMER *et al*., 2003).

Dependendo da espécie, as manifestações clínicas podem evoluir e causar quadro de malária cerebral, que é a principal causa de morte pela doença (GREEN *et al.*, 1994; HUNT & GRAU, 2003; CLARK & COWDEN, 2003).

Nessa forma mais complexa da doença, vários fatores são responsáveis pelos sintomas neurológicos, tais como fenômeno de citoaderência e participação de mediadores químicos liberados durante a infecção malárica (PERKINS *et al.*, 2013).

1.1.3. Modelos experimentais

Devido grande relevância da doença e dificuldade em enteder a patologia, diversos modelos experimentais têm sido estabelecidos com a finalidade de esclarecer vias potenciais pelas quais a patologia pode evoluir durante a MC (POTTER *et al.,* 2006), além de entender os mecanismos de interação parasito-hospedeiro, assim como estudos com potenciais agentes quimioterápicos (GRENNBERG *et al.,* 1950; MANEERAT *et al*., 2000; TAYLOR-ROBINSON, 2004).

Atualmente o modelo mais bem estudado é o de camundongos, com o *P. berghei* cepa ANKA (causa malária cerebral), no entanto encontramos modelos de macacos, ratos, e aves (DE SOUZA & RILEY, 2002; SLATER, 2005). Embora nenhum deles seja exatamente igual à malária humana, eles reproduzem alguns aspectos comuns relacionados à patologia e imunologia, o que pode esclarecer mecanismos fisiológicos envolvidos na patogênese da doença (MENDIS *et al*., 2001; DE SOUZA & RILEY, 2002; SLATER, 2005). Recentemente, foi descrito alterações histopatológicas no cérebro, além de produção de óxido nítrico (NO), em galinhas infectadas por *P. gallinaceum*, tornando este modelo mais uma ferramenta de estudos para a patogênese da doença (MACCHI *et al.*, 2010).

1.2. MALÁRIA AVIÁRIA: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária aviária tornou-se conhecida após a descoberta do *P. gallinaceum*, por Brumpt, em 1935, ao observar esfregaços sanguíneos de galinha. A malária em galinhas domésticas pode ser causada por duas espécies de plasmódios: *Plasmodium juxtanucleare* e *Plasmodium gallinaceum*, onde no Brasil apenas o *P. juxtanucleare* é encontrado em infecção natural (KRETTLI, 1972; MOTA *et al.*, 2000).

A partir da descoberta por Brumpt, o *P. gallinaceum* foi um dos plasmódios mais estudados em todo o mundo como modelo para atividade de drogas com potencial antimalárico (PARAENSE, 1946; GARNHAN, 1966).

O modelo de malária aviária é bastante interessante pelo fato do *P. gallinaceum* estar, em alguns aspectos, próximo ao *P. falciparum*, e desencadear um quadro de malária clínica também semelhante, apresentando sinais e sintomas de

malária cerebral, decorrente da forma exo-eritrocitica encontrada em cérebros de animais infectados (PARAENSE, 1946).

Dentre os aspectos semelhantes entre *P. gallinaceum* e *P. falciparum* citamos o antígeno de superfície, a proteína circumesporozoíta (CS). Essa proteína que favorece a infecção apresenta grande similaridade entre as duas espécies (KRETTLI, 1994). A proteína CS recobre a superfície de esporozoítos que invadem hepatócitos em mamíferos e macrófagos em aves. O gene que codifica a proteína CS do *P. gallinaceum* foi caracterizado e comparado aos domínios funcionais de outros plasmódios e, na proteína foram observadas as mesmas características, incluindo sequência sinal secretora e regiões centrais com aminoácidos repetidos. A comparação das seqüências sinais da proteína CS revelou quatro diferentes grupos, onde o *P. gallinaceum* apresenta maior proximidade ao *P. falciparum* (MCCUTCHAN *et al.*, 1996) (Figura 3).

A relação do *P. gallinaceum* com outras espécies de plasmódios de mamíferos é fonte de inúmeras revisões, com controvérsias entre elas (WATERS *et al*., 1991; SIDDALL & BARTA, 1992; ESCALANTE & AYALA, 1994; MCCUTCHAN *et al.*, 1996; QARI *et al.*, 1996; PERKINS & SCHALL, 2002; ROY E IRIMIA, 2008; SILVA *et al.*, 2010). Alguns estudos evolutivos demonstram proximidade entre as espécies ao analisar diferentes seqüências gênicas (MCCUTCHAN *et al.*, 1996; ESCALANTE & AYALA, 1994).

As diferenças entre as espécies *P. gallinaceum* e *P. falciparum* estão principalmente relacionadas à complexidade do ciclo, como o desenvolvimento inicial do esporozoíto, que em mamíferos ocorre nos hepatócitos, e em aves esta fase inicial do ciclo ocorre nos macrófagos e células endoteliais (HUFF *et al.*, 1960; KRETTLI & DANTAS, 2000). O ciclo biológico de *Plasmodium sp.* em aves apresenta três fases distintas: exo-eritrocítica e eritrocítica, na ave e a fase esporogônica no mosquito (HUFF *et al.*, 1960; GARNHAN, 1966). Na malária por *P. gallinaceum* ocorre uma fase exo-eritrocítica secundária, em conseqüência da liberação dos merozoítos do primeiro ciclo exo-eritrocítico. Essas formas invadem novas células teciduais e dão continuidade ao ciclo (KRETTLI, 1994; STAINES *et al.*, 2002). Existem evidências que sugerem que o *P. falciparum* utilize macrófagos teciduais para seu transporte até os hepatócitos. No entanto, o ciclo eritrocítico nas duas espécies está relacionado às manifestações clínicas da doença como a malária cerebral (PARAENSE, 1946; STAINES *et al.*, 2002).

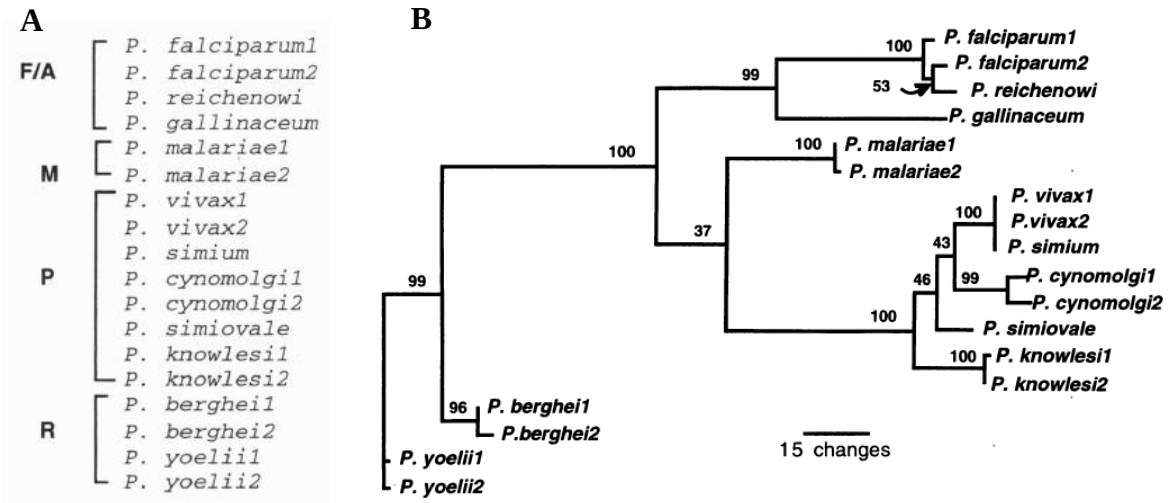

Figura 3: Filograma baseado na análise da proteína circumesporozoíta (CS). A, divisão em quatro grupos baseados na análise da seqüência sinal de aminoácidos: plasmódio aviário com *P. falciparum* - A/F; *P. malariae* - M; plasmódios de primatas - P; plasmódios de roedores - R. B, árvore filogenética que mostra a localização dos quatro grupos. Os números mostrados acima dos ramos são porcentagens de bootstrap baseadas em 100 replicatas. Fonte: adaptado de MCCUTCHAN *et al.*, 1996.

FREVERT *et al.* (2008) demonstram o desenvolvimento inicial das formas exo-eritrocíticas de *P. gallinaceum* em aves com 2-4 dias de idade, expostas a picadas de mosquitos *A. aegypti* infectados com esse *Plasmodium*. Após estabelecimento da infecção os estágios primários foram localizados em diferentes órgãos. Foi mostrado estágios exo-eritrocíticos iniciais em fígado, cérebro, baço, coração, rim e pulmão. No fígado, os parasitos foram encontrados primeiramente nas células de Kupffer, com localização no sinusóide. Em galinhas, os esquizontes hepáticos são menores e com menos parasitos quando comparados com os de mamíferos (MEIS & VERHAVE, 1988; FREVERT *et al.*, 2008). Quando analisaram o cérebro, os estágios exo-eritrocíticos primários no endotélio eram semelhantes em tamanho aos encontrados no fígado. Microscopia eletrônica revelou estágios exoeritocíticos primários no interior das células de Kupffer do fígado, macrófagos esplênicos, endotélio vascular do pulmão, cérebro e coração, assim como nos rins (FREVERT *et al.*, 2008).

A malária na fase crônica é assintomática e raramente fatal, porém torna as aves hospedeiras fontes permanentes de infecção. Já na fase aguda da malária, a ave pode apresentar sintomas neurológicos, decorrentes de lesões cerebrais, o que gera a incoordenação motora, fraqueza nas pernas com eventuais paralisias e distúrbios sistêmicos como perda de apetite, diarreia com fezes esverdeadas, anemia, geralmente evoluindo para a morte do animal (PERMIN & JUHL, 2002; WILLIAMS, 2005; MACCHI *et al.*, 2010).

O modelo de malária aviária em galinhas domésticas dominou os estudos da biologia dessa doença de 1890 a 1940 (PARAENSE, 1946; GARNHAN, 1966) com um recente retorno (KRETTLI *et al.*, 2001; PERMIN & JUHL, 2002; SLATER, 2005; WILLIAMS, 2005; FREVERT *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2009; MACCHI *et al*., 2010; Macchi *et al*., 2013). Dessa forma, o modelo de malária aviária se torna ferramenta alternativa para estudar a fisiopatologia da malária cerebral, principalmente por apresentar características comuns tanto à malária humana, quanto ao bem estabelecido modelo experimental com *P. berghei* em camundongos (DE SOUZA & RILEY, 2002). Assim, torna-se possível investigar diversos aspectos da patogênese da doença com finalidade de compreender os mecanismos envolvidos. Além disso, o modelo de malária aviária pode trazer novas perspectivas de testes de novos produtos bioativos obtidos de plantas medicinais e melhorar a

compreensão de aspectos fisiológicos e imunológicos de galinhas, aves de grande importância econômica.

1.3. MALÁRIA CEREBRAL

Várias hipóteses tentam explicar os mecanismos envolvidos na patogênese da malária cerebral. As hemácias infectadas pelo *Plasmodium falciparum* possuem a capacidade de aderir às células do endotélio da microcirculação (hipótese conhecida como “sequestro de eritrócitos” ou citoaderência). Esse sequestro de eritrócitos é causado pela expressão de antígenos do parasito na superfície de eritrócitos infectados e expressão de moléculas de adesão (BERENDT *et al*., 1994; HEARN *et al.*, 2000; DIETRICH, 2002). A superfície do eritrócito parasitado é recoberta por protusões denominadas “knobs” (proteínas secretadas pelo parasito e expressas na superfície dos eritrócitos) (WAHLGREN *et al*, 1992; HALDAR *et al.*, 2005). Estes “knobs” modificam o metabolismo normal da célula hospedeira, favorecendo a sobrevivência do parasito e sendo crucial para o desenvolvimento da patologia da malária grave, uma vez que aderem às células endoteliais através de moléculas produzidas por elas mesmas, as quais servem de ligantes entre os eritrócitos parasitados e o endotélio (DANIEL-RIBEIRO & FERREIRA-DA-CRUZ, 2000; CLARK & COWDEN, 2003; HALDAR *et al.*, 2005). Citoaderência designa também a adesão de eritrócitos infectados a eritrócitos não infectados, fenômeno amplamente conhecido como "rosetting", que parece ser o fator potencializador do desenvolvimento patológico da malária (WAHLGREN *et al*, 1994; DIETRICH, 2002; KIRCHGATTER & PORTILLO, 2005).

Embora o fenômeno da citoaderência esteja envolvido na patogênese da malária grave, essa hipótese sozinha não explica as características da malária cerebral, evidenciando uma segunda hipótese, que seria o resultado de uma resposta exacerbada do sistema imune, com participação de células T e moléculas de adesão (ativadas no endotélio vascular) e liberação de citocinas pró-inflamatórias e mediadores imunes, como TNF-α (fator de necrose tumoral alfa), IFN-γ (interferon gama), ILs (interleucinas) e NO (óxido nítrico) por linfócitos e macrófagos, que induz destruição tecidual (Figuras 4A e 4B) (LEPENIES *et al.,* 2008).

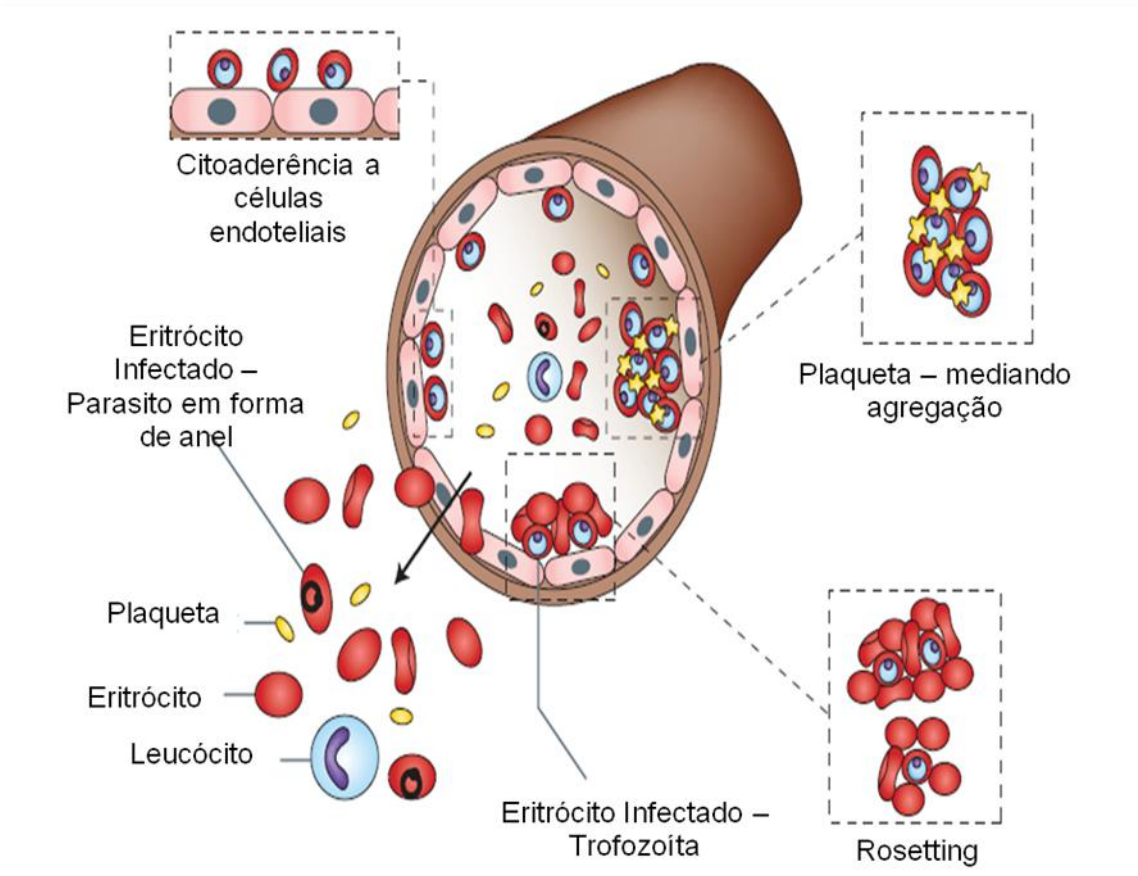

Figura 4A: Citoaderência de eritrócitos infectados e não infectados a células endoteliais de vasos da microcirculação cerebral durante um quadro de MC, formando assim um “rosetting” (células agregadas) juntamente com plaquetas e consequentemente causando a obstrução dos vasos podendo gerar um quadro de hipóxia.

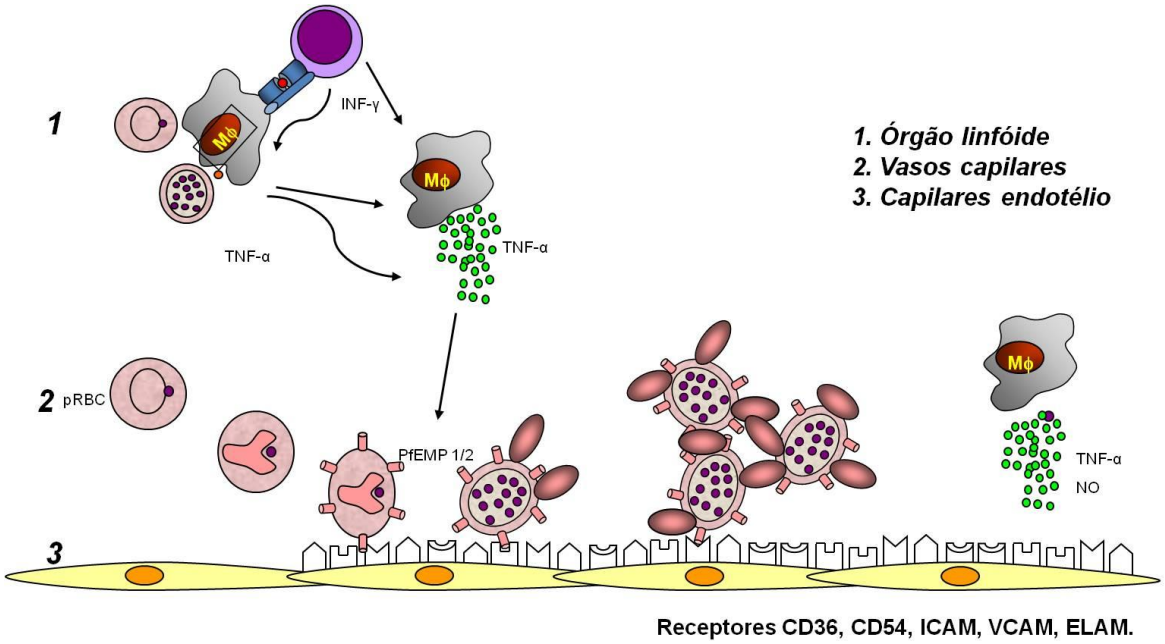

Figura 4B: Hipótese para o mecanismo da patogênese da malária cerebral. (1) Monócitos-macrófagos estimulados por antígenos do parasito (expressos na superfície da hemácia) e por citocinas (liberadas por linfócitos em resposta a infecção) produzem grandes quantidades de TNF-α, induzindo a expressão aumentada de vários receptores nas células endoteliais. (2) Hemácias parasitadas aderem ao endotélio ativado (3), através da PfEMP1/2 e também às hemácias normais (rosetas) por meio de ligantes de membrana. (4) Monócitos circulantes liberam TNF-α e NO no local, agravando a lesão. Abreviaturas: PfEMP1/2, proteína de superfície de merozoíto de *Plasmodium*; ICAM, molécula de adesão intercelular; VCAM, molécula de adesão vascular; ELAM, molécula de adesão leucócito-endotélio; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; NO, óxido nítrico. Fonte: adaptado de Daniel-Ribeiro & Ferreira-da-Cruz, 2000.

1.4. ÓXIDO NÍTRICO

O Óxido Nítrico (NO) é uma molécula lipofílica pequena que pode ser rapidamente difundida através das barreiras da membrana celular e desse modo pode alcançar os compartimentos intracelulares de células adjacentes com funções diversificadas (IGNARRO, 1990).

Em mamíferos, o NO participa de diversas funções biológicas que vai desde a regulação da pressão sanguínea e o processo de neurotransmissão até a formação de um mecanismo de proteção contra diversos microrganismos (ALDERTON *et al*., 2001). O NO é produzido pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) (GRIFFITH *et al*., 1995).

Essa enzima existe em três isoformas, Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS), Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) e Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS). A isoforma nNOS é uma enzima constitutiva presente em muitos neurônios no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso autonômico (SNA) (McCANN,1997). A isoforma eNOS gera a molécula de NO no sistema cardiovascular, onde vai servir como uma importante molécula de sinalização (BAEK *et al.,* 1993) No sistema cardiovascular o NO tem como principais funções a vasodilatação, inibição da proliferação de células do músculo liso vascular, atenuante da adesão de células inflamatórias no endotélio e inibição da agregação plaquetária (NASEEM, 2005). A isoforma pesquisada neste plano é a iNOS, produzida por macrófagos diante da ativação por patógenos intracelulares, determinadas células tumorais, produtos microbianos como o LPS, hemozoína e citocinas, como IFN-γ (COBAN *et al*., 2006; GUTSCHOW *et al.,* 2013). A produção de NO por macrófagos ativados é uma importante resposta immune inata, implicada com a atividade bactericida dos macrófagos.

1.4.1. Formação do Óxido Nítrico

O NO é produzido pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) que na presença de NADPH catalisa a conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO, em proporção equimolar (BREDT & SNYDER, 1994). As isoformas de NOS são divididas em duas categorias, onde a primeira categoria depende de Ca^{2+} e

calmodulina e a segunda categoria necessita da indução por citocinas. Todas as isoformas precisam da presença dos co-substratos NADPH e O_2 para que haja a formação de NO e do aminoácido Citrulina em proporções equimolares (MARLETTA *et al.,* 1993). Há estudos que demonstram que a Tetrahidrobiopterina (BH4) funciona como um co-fator essencial para a atividade da iNOS (TAYEH & MARLETTA, 1989)

A biossíntese do NO (Figura 5) acontece a partir da conversão do aminoácido L-arginina, por uma via bioquímica específica, ocorrendo esse processo em diversas células com a participação da enzima NOS (MONCADA *et al*., 1991). O NO é gerado enzimaticamente pela família das enzimas NOS, que é homóloga a citocromo P450 redutase. Para a formação do NO é necessário a oxidação do terminal nitrogênio-guanidina da arginina e essa reação acontece pela Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido (NADPH) e flavinas, como Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (FAD) e Mononucleotídeo de Flavina (FMN), Tetrahidrobiopterina e Tiol como co-fatores enzimáticos adicionais (ANDRADE *et al*., 1997).

A inibição da atividade das isoformas é feita pela ação de inibidores competitivos, que se assemelham ao substrato da enzima, e se ligam ao seu sítio favorecendo o bloqueio da atividade. Os inibidores clássicos da nNOS são a L-nitroarginina (L-NARG) e L-nitro-arginina metil ester (L-NAME) e são caracterizados como inibidores irreversíveis da atividade da NOS constitutiva (DWYER *et al*., 1991). A aminoguanidina (AG) atua como inibidor irreversível da isoforma induzida (CORBERTT & MCDANIEL, 1996; BOER *et al.*, 2000).

1.4.2. Óxido Nítrico e Malária

Um dos mediadores químicos bastante estudados na malaria cerebral é o NO. O NO é um gás solúvel, sintetizado por células endoteliais, macrófagos e um grupo de neurônios, que tem papel na sinalização extra e intracelular e é também agente microbicida (CLARK *et al*., 1997; BOGDAN, 2001).

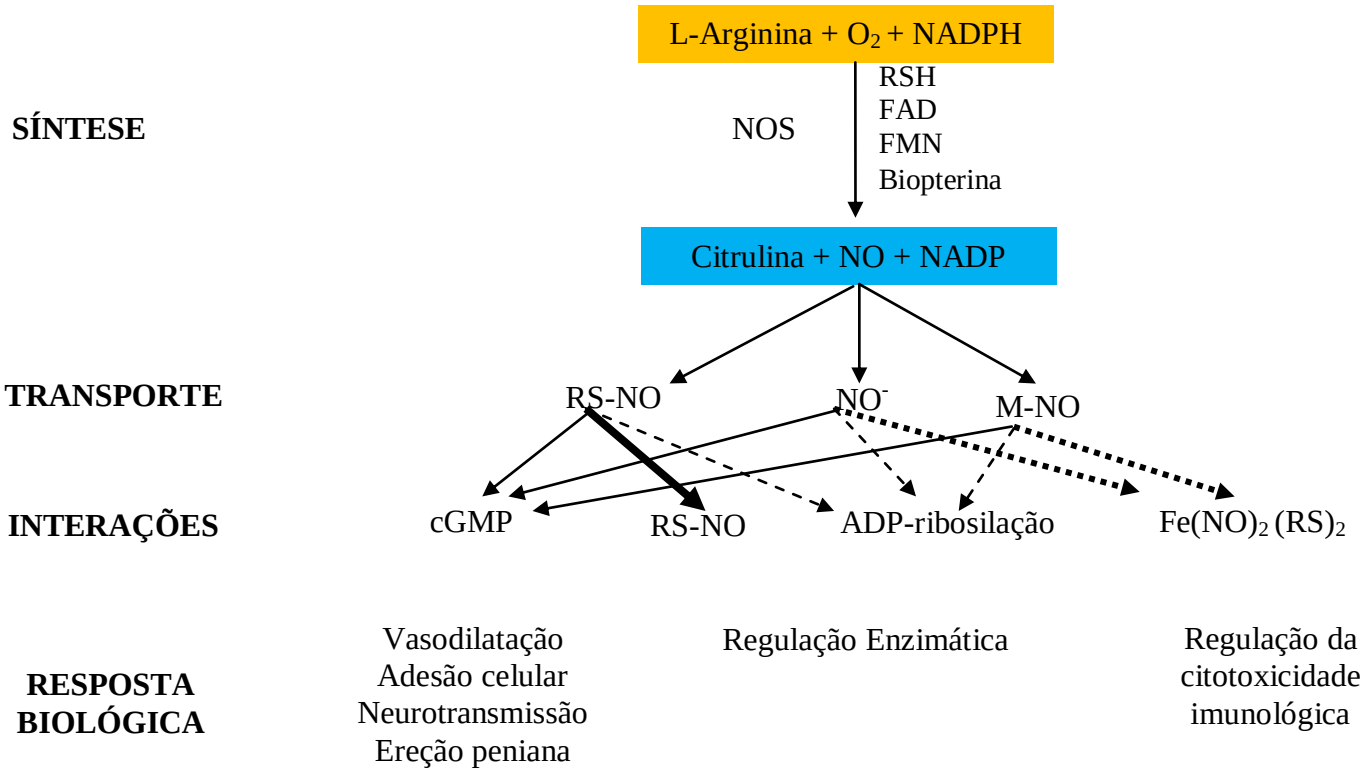

Figura 5: Biossíntese do NO e propriedades biológicas de cada composto formado. NOS converte L-arginina em citrulina e na forma redox do NO, na presença de oxigênio e NADPH e outros co-fatores como RSH, FAD, FMN e Biopterina. Fonte: STAMLER *et al*., 1992.

Apesar de várias hipóteses correlacionarem o NO com malária cerebral, uma vez que as alterações neurais associam-se a elevados níveis de citocinas levando a geração de NO, na parede celular, pela iNOS (CLARK *et al*., 1991, GHIGO *et al*., 1995), seu papel dentro desse contexto ainda permanece obscuro. Estudos demonstraram que o desenvolvimento da malária cerebral murina não produz NO, quando Rudin *et al.*, (1997) observaram que camundongos deficientes de iNOS desenvolviam malária cerebral, sugerindo não ser o NO um fator essencial para o desenvolvimento da malária cerebral. Essa hipótese foi suportada por Favre *et al.* (1999), que obtiveram resultados semelhantes. Por outro lado, outros estudos demonstraram a participação desta molécula moduladora no quadro de malária cerebral (GHIGO *et al*., 1995; HOBBS *et al*., 2002).

Uma hipótese seria uma superprodução de NO pela isoforma nNOS após liberação de cálcio estimulada por receptores NMDA ativados por aumento de glutamato, cujo transporte está alterado pelo quadro de hipóxia causada por obstrução dos vasos (CLARK *et al*., 1997). Essa superprodução desregula o papel do NO no cérebro, levando a alterações na consciência (coma), frequente no quadro de malária cerebral (CLARK & COWDEN, 2003).

Outra hipótese para o envolvimento do NO na patogênese da doença, seria uma resposta exacerbada do sistema imune, com produção de NO pela isoforma induzida da enzima. Esse NO inibe proliferação de células B e T e modula a produção de citocinas, que por sua vez, ativam a iNOS (KREMSNER *et al*., 1993). Estudo feito por ANSTEY *et al*. (1996), corroborado por PERKINS *et al.* (1999) e CHIWAKATA *et al*. (2000), demonstraram que níveis de NO produzido pela iNOS está inversamente correlacionado com a severidade da doença. Eles observaram a não existência dessa super produção e, ainda, que o NO derivado da iNOS possui papel bastante controverso.

Outros estudos demonstraram a participação desta molécula no quadro de malária cerebral. MANEERAT *et al.* (2000) verificaram a expressão aumentada de iNOS em cérebros *post mortem* de crianças com malária; MACCHI *et al.* (2010) demonstraram aumento na produção de nitrito por macrófagos de animais infectados com *P. gallinaceum* e, Macchi *et al.* (2013) observaram que animais tratados com inibidor de NOS tem maior sobrevida e diminuição dos sinais clínicos, evidenciando a participação do NO na patologia da doença.

1.4.3. Óxido nítrico e malária aviária

Considerando que o NO é molécula importante para a patogênese da malária, a necessidade de elucidação dos mecanismos que envolvem sua participação, como inibição da NOS, torna-se uma importante linha de pesquisa. Nesse contexto, a malária aviária torna-se excelente modelo, uma vez que reproduz aspectos da malária cerebral encontrados em outros modelos animais, podendo auxiliar na elucidação do papel do NO.

Existem estudos em galinhas envolvendo inibição farmacológica da NOS, com resultados satisfatórios. WIDEMAN *et al.* (2005; 2006) demonstraram a participação de NO na modulação da resposta da pressão arterial pulmonar após injeção de micropartículas. Para isso, utilizaram L-NAME, inibidor das isoformas nNOS e iNOS e Aminoguanidina (AG), inibidor seletivo da isoforma iNOS. Em trabalho recente, MACCHI *et al.* (2013), demonstraram que galinha tratadas com AG são mais resistentes à infecção por *P. gallinaceum* devido redução de anemia, trombocitopenia e inflamação. Portanto, já se conhece as concentrações de moléculas que bloqueiam a produção de NO em galinhas. Outros trabalhos evidenciam a eficácia de AG em malária aviária, por *P. relictum*, onde AG aumenta parasitemia, mas diminui a mortalidade em canários (BICHET *et al.*, 2012).

Neste sentido pretende-se estudar neste trabalho aspectos fisiológicos da malária aviária com o bloqueio da produção de NO, pelo inibidor AG. Esse estudo proporcionará o melhor entendimento do modelo de malária aviária em galinhas, incluindo a cerebral, e envolvimento do sistema nitrérgico em galinhas infectadas com *P. gallinaceum*.

Nesses últimos anos, temos desenvolvido, em colaboração com a UENF, o modelo aviário de malária cerebral (MACCHI *et al*., 2010). Mostramos que o durante a infecção o cérebro apresenta alterações patológicas relevantes e macrófagos derivados de monócitos sanguíneos produzem altas concentrações de NO (MACCHI *et al*., 2010). Mais recentemente, ao utilizar esse mesmo modelo, caracterizamos que durante o desenvolvimento da malária aviária, o bloqueio do NO, reduz anemia, trombocitopenia, inflamação e uma maior sobrevida dos animais, apesar desses animais apresentarem um aumento da parasitemia (MACCHI *et al*., 2013).

Apesar desses esforços, não conseguimos fazer uma correlação mais direta entre a inibição da atividade da iNOS e a melhoria dos sinais clínicos da malária,

justamente por falta de um anticorpo que reconheça essa enzima de galinha, pois não existe reação cruzada dos anticorpos comerciais de mamíferos em aves. Para contornar essa dificuldade, usaremos uma estratégia para purificar a iNOS de uma linhagem de macrófagos de galinha (HD11) ativada *in vitro* com LPS.

A iNOS exibe atividade diaforásica que pode ser facilmente revelada por técnicas histoquímicas e bioquímicas (MITCHELL *et al*., 1992). Essa mesma estratégia foi utilizada para demonstrar o desaparecimento dessa enzima nos macrófagos HD11 infectados com *T. gondii* (GUILLERMO & DAMATTA, 2004).

1.5. SISTEMA IMUNOLÓGICO: ASPECTOS GERAIS

O sistema imunológico possui como função fisiológica reconhecer o que é próprio de cada organismo para poder ter a capacidade de reconhecer agentes infecciosos ou agentes químicos que possam causar algum tipo de dano tecidual (ABBAS *et al*., 2008).

O sistema imunológico é dividido em imunidade inata (natural) e imunidade adaptativa (adquirida). Esses dois componentes do sistema imune têm sido caracterizados independentemente, no entanto, o sistema imune adaptativo é um dos principais interesses no campo da imunologia (TAKEDA *et al.,* 2005).

O sistema imune inato destaca-se como a primeira defesa contra microrganismos infecciosos, no qual macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos NK (natural-killer) são as principais células envolvidas na primeira defesa do organismo. Apesar de pouco estudado o sistema imune inato é de grande importância para ativação do sistema imune adaptativo (PALM *et al*., 2009).

O sistema imune inato não é tão eficiente quanto o sistema adaptativo, porém as células possuem receptores de reconhecimento padrão que podem ativar uma discreta resposta imunológica (KUMAR *et al*., 2009). Esses receptores têm como função reconhecer Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), tais como determinados fatores de virulência, antígenos presentes em bactérias, vírus, fungos e protozoários, assim como proteínas de choque térmico do hospedeiro (JANEWAY, 1992; LOHARUNGSIKUL *et al.,* 2008; ABBAS *et al*.,2008).

Receptores de reconhecimento padrão quando ativados pelos PAMPs, geram uma cascata de sinalização intracelular com recrutamento de proteínas cinases que

ativam fatores de transcrição nuclear. Esses fatores estimulam a expressão gênica de citocinas (proteínas sinalizadoras que regulam mecanismos imunológicos) e de enzimas, como a ciclooxigenase 2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), envolvidas em processos infecciosos e inflamatórios (OOI *et al*., 2010; ANDERSON *et al*., 1996).

Os macrófagos possuem receptores de reconhecimento, nos quais a ligação de determinados PAMPs, como o lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas como interferon-γ (IFN-γ), ativam uma série de cascatas de sinalização (AKTAN, 2003; HE *et al*., 2003). A ativação desses receptores pode levar ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, de enzimas que irão induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) ou mesmo que sintetizam eicosanóides, como a enzima COX-2 (CUZZOCREA *et al*., 2000). Os produtos derivados de macrófagos ativados constituem proteínas importantes na mediação do processo inflamatório (GORDON *et al*., 2003; ANDERSON *et al*., 1996).

1.5.1. A imunidade inata e macrófagos

Macrófagos são fagócitos residentes em tecidos linfoides e não linfoides e acredita-se que eles estejam envolvidos na homeostase dos tecidos, na remoção de células apoptóticas e na produção de fatores de crescimento e eles possuem uma grande variedade de receptores para o reconhecimento de patógenos, o que faz dessa célula um importante fagócito e indutor da produção de mediadores da inflamação (GORDON, 2002).

Diversas pesquisas demonstraram que para a ativação dos macrófagos é necessário que haja a atuação de células T helper e células NK. Essas células irão produzir determinadas citocinas, em particular o IFN-γ, porém os macrófagos também podem ser ativados por uma rede de citocinas envolvendo a interleucina-12 (IL-12) e a interleucina-18 (IL-18), que são produzidas por células apresentadoras de antígenos (APCs) (GORDON, 2003). Estudos com camundongos e humanos com deficiências genéticas dessas citocinas e seus receptores têm validado a importância dessa via sinalização na imunidade celular, síndromes de imunodeficiência, dano tecidual e artrite reumatoide (GORDON, 2003).

Atualmente, em experimentos *in vitro* para testes de agentes anti-inflamatórios, utiliza-se o LPS como ativador de macrófagos, pois ele é capaz de estimular a expressão de enzimas como a iNOS, dependente da ativação do NF-κB, através da ativação de proteínas adaptadoras e proteínas cinases que atuarão nessa via de sinalização. (HUANG *et al.*, 2012).

Algumas células do sistema imune possuem em sua membrana, ou em endossomos, determinados receptores de reconhecimento padrão, dentre os quais, desde os anos 90, os receptores Toll-Like têm sido alvo de diversas pesquisas (LUGER *et al.,* 2013). Esses receptores participam de uma resposta imunológica inata a determinadas moléculas antigênicas, produzidas por patógenos, como bactérias, vírus e protozoários (ZHU *et al.,* 2012).

Para que o macrófago seja ativado por LPS, primeiramente o LPS liga-se a uma Proteína Ligadora de LPS (LBP) solúvel no sangue ou no líquido extracelular. O complexo LPS-LBP se liga a uma proteína solúvel no plasma, a CD14, e a LBP se dissocia formando o novo complexo, LPS-CD14, o qual se liga a Receptor Toll-Like 4 (TLR-4) (MAESHIMA *et al.*, 2012). O TLR-4 responde ao LPS bacteriano ativando duas diferentes vias de sinalização. Em uma das vias, duas proteínas são recrutadas, MyD88 (proteína adaptadora) e Mal (proteína adaptadora)/TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio TIR), e levam a ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB com envolvimento de algumas proteínas cinases (LIAN *et al*., 2012;. WU *et al,* 2013). A ativação do fator de transcrição nuclear leva a ativação da expressão gênica para determinadas enzimas, tais como iNOS (ZUO *et al.,* 2013; SHAH *et al.,* 2013). Diante do exposto se torna interessante a purificação da iNOS através de macrófagos ativados com determinados PAMPs.

1.6. UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNA PURIFICADA

Temos desenvolvido o modelo de malária aviária para estudar macrófagos ativados por PAMPS oriundos da infecção por *Plasmodium gallinaceum* (MACCHI, 2010). Assim, torna-se possível investigar diversos aspectos da patogênese da doença com finalidade de compreender os mecanismos envolvidos na resposta primária da infecção malárica durante a ativação de macrófagos induzida pelos PAMPs. Entretanto, os anticorpos anti-iNOS existentes no mercado não reagem

contra espécies da classe das aves, o que caracteriza a necessidade do desenvolvimento de metodologias bioquímicas que levem a purificação da enzima e obtenção de anticorpos específicos.

O NO é um mediador importante produzido por macrófagos após ativação por PAMPs. Dentro desse contexto se torna importante pesquisar metodologias de purificação da iNOS de macrófagos ativados via citocinas, como o IFN-γ, e PAMPs, como o LPS e os presentes no *P. gallinaceum*, como o Glicosilfosfatidilinositol (GPI) e a hemozoína. Esses aspectos são essenciais para entender as vias que têm como produto final da sua ativação a produção de citocinas e principalmente, do neurotransmissor e mediador inflamatório, NO, através da transcrição da iNOS.

Os modelos de malária têm demonstrado a participação do neurotransmissor NO na patogênese da doença (RUDIN *et al.*, 1997; MACCHI *et al.*, 2010). Dentro desse contexto, o óxido nítrico possui um duplo papel, podendo ser microbicida, auxiliando no controle do aumento da parasitemia, ou ainda, produzido por macrófagos frente à resposta inflamatória gerada pelo parasito (TAYLOR-ROBINSON & SMITH, 1999; TAYLOR-ROBINSON, 2000; MACCHI *et al.*, 2010).

Resultados preliminares indicam que é possível detectar em gel de poliacrilamida a atividade diaforásica da iNOS de macrófagos HD11 ativados com LPS. A hipótese é localizar as bandas com atividade diaforásica, purificar a proteína e produzir um anti-iNOS de galinha em coelho. Portanto, o estudo de imunolocalização no cérebro poderá ser realizado ao longo do curso da malária aviária e verificar o papel do NO na malária cerebral. Além disso podemos observar a modulação direta do sistema nitrérgico sobre os sinais importantes para sobrevivência dos animais infectados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do NO, durante a infecção da malária aviária, em modelo experimental *in vivo*, usando como agente *P. gallinaceum*, e *in vitro*, com linhagens HD11 de macrófagos de galinha.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar sobrevivência e desenvolvimento de parasitemia em aves infectadas com *P. gallinaceum* e tratadas ou não com aminoguanidina.
- Mensurar os níveis de nitrito/nitrato no plasma de galinhas infectadas com o *P. gallinaceum* tratadas ou não com aminoguanidina.
- Mensurar os níveis de nitrito em cultura de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas infectadas com o *P. gallinaceum* tratadas ou não com aminoguanidina, em diferentes parasitemias.
- Avaliar a produção de nitrito de macrófagos da linhagem HD11 após estimulação com LPS
- Detectar a atividade diaforásica das proteínas após separação em gel de eletroforese na linhagem celular HD11 após estimulação com LPS.

3. MATERAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E CEPA

Foram utilizadas aves da espécie *Gallus gallus*, com 15 dias pós-eclosão, adquiridas em uma granja local. As aves foram mantidas em gaiolas teladas à temperatura ambiente, com água e ração balanceada (livre de coccidiostáticos) *ad libitum*, no biotério da Universidade Federal do Pará.

Para indução do quadro de malária foi utilizado o protozoário *Plasmodium gallinaceum*, cepa 8A, cedido pela Dr. Paulo Pimenta do Centro de Pesquisa Fundação Oswaldo Cruz (Belo Horizonte-Minas Gerais). O parasito foi mantido por sucessivas passagens em frangos e em seu vetor experimental (*Anopheles darlingi*).

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para todos os experimentos, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

- Controle Negativo: Animais não infectados com *P. gallinaceum* e não tratados com Aminoguanidina.

- Controle Positivo: Animais não infectados com *P. gallinaceum* e tratados com Aminoguanidina.

- Infectado Negativo: Animais infectados com *P. gallinaceum* e não tratados com Aminoguanidina.

- Infectado Positivo: Animais infectados com *P. gallinaceum* e tratados com Aminoguanidina.

Para os experimentos de sobrevivência e curva de parasitemia, os animais foram monitorados até a morte natural. Para todos os outros experimentos, as aves foram sacrificadas em diferentes parasitemias.

3.3. TRATAMENTO COM AMINOGUANIDINA (AG) E INFECÇÃO COM *P.gallinaceum*

O tratamento com AG foi iniciado dois dias antes da infecção com o parasito, com dose de 25 mg/Kg, será administrada diariamente por via intraperitoneal. A dose foi obtida com base em estudos anteriores (Wideman *et al.*, 2005; 2006). Antes

da inoculação do grupo experimental, uma amostra da cepa foi descongelada e inoculada em uma ave para garantir a virulência da cepa. Com parasitemia de aproximadamente 20%, a ave doadora foi sacrificada e o sangue coletado por punção cardíaca, com seringa contendo anticoagulante. O sangue foi diluído com solução PBS a fim de alcançar a concentração desejada de $5x10^6$ eritrócitos parasitados, em volume final de 50µL. O inóculo foi obtido após quantificação do total de hemácias em câmara de Neubauer e correção pela parasitemia da ave doadora. Cada ave recebeu um inóculo de 50 µl por via intramuscular. As aves foram clinicamente examinadas e monitoradas diariamente, a partir do 4º dia pós-infecção (dpi).

3.4. DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA

A partir do 4º dia pós-infecção, a parasitemia foi acompanhada diariamente através da técnica da extensão sanguínea de uma amostra do sangue periférico corada pelo método do panótico rápido. O resultado é expresso em percentagem de hemácias parasitadas em relação ao controle. A contagem de eritrócitos parasitados foi feita em um microscópio de luz com objetiva de 100x.

3.5. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO PLASMA

Para avaliar a produção total de NO, foi mensurado seus metabólitos (nitrato e nitrito) no plasma, através do método Reagente de Griess para detecção de nitrito após conversão enzimática de nitrato em nitrito. O plasma foi obtido após centrifugação do sangue coletado com EDTA, para evitar precipitação que pode ocorrer quando o reagente de Griess é a adicionado ao sangue heparinizado. Para mensurar o nitrito, o nitrato da amostra foi reduzido a nitrito utilizando a enzima nitrato redutase (purificada de *Aspergillus*) na presença de NADPH. A mistura foi incubada por 3h a temperatura ambiente e o nitrito total mensurado pelo reagente de Griess (Green *et al*., 1982). Após redução a nitrito, 100µL da amostra foi colocada em uma placa de 96 poços, onde foi acrescentado 100µL do reagente de Griess. Após 10 minutos de reação, as amostras foram submetidas ao leitor de ELISA com comprimento de onda de 540nm. As concentrações de nitrito nas amostras foram

determinadas através do fator obtido da curva padrão com diluições seriadas de nitrito de sódio a concentrações conhecidas, e os valores expressos em µM.

3.6. CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Monócitos de animais não-infectados e infectados, tratados ou não com AG em diferentes parasitemias, foram obtidos a partir do sangue periférico das aves e cultivados em lamínulas, como descrito por DaMatta *et al* (1998). Foram coletadas, por punção cardíaca, amostras de 2 ml de sangue, que foram diluídas (1:1), em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) sem soro. Para obtenção dos monócitos, as amostras foram passadas em um colchão de Histopaque (índice de refração 1,347), e centrifugadas a 600g, 25ºC por 20 minutos. Após centrifugação, o plasma foi descartado e os leucócitos, identificados através de um anel formado devido o gradiente de concentração, transferidos para outro tubo. As células foram lavadas duas vezes com solução de PBS (500 g, 4 ºC, 10 minutos – baixa temperatura para garantir a não-aderência das células à parede do tubo) e ressuspendidas em DMEM sem soro. A concentração de células para plaqueamento foi ajustada para $2x10^7$ células/ml, onde 150µl foi plaqueado por poço em placa de 24 poços. Após 1h em estufa a 37 ºC e atmosfera 5% de CO_2, as células foram lavadas para remoção das células não-aderentes, e adicionado DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24h de cultivo, foi feita uma nova lavagem das células, e após 48h o sobrenadante foi recolhido, para dosagem de nitrito.

3.7. PRODUÇÃO DE NITRITO EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO E EM CÉLULAS HD11

A produção de NO foi avaliada através da quantificação de seu metabólito nitrito, utilizando-se o método do Reagente de Griess (Green et al., 1982). Após 24 horas de estímulo com LPS, 100 µl da amostra foi colocada em uma placa de 96 poços, e acrescentada 100 µl do reagente de Griess (50 µl de sulfanilamida 1% e 50 µl de naftiletilenodiamina 0,1%, ambos preparados em solução de ácido fosfórico 2.5%). Após 10 minutos de reação, as amostras foram submetidas ao leitor de

ELISA com comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de nitrito nas amostras foram determinadas através do fator obtido da curva padrão com diluições seriadas de nitrito de sódio a concentrações conhecidas.

3.8. LINHAGEM CELULAR DE MACRÓFAGOS DE GALINHA (HD11)

A linhagem celular de macrófagos de galinha (células HD11), gentilmente cedida pelo Dr. Renato DaMatta, Universidade Estadual do Norte Fluminense, foi cultivada em meio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagles Media: nutrient mixture F12) suplementado com 10% de FBS (soro fetal bovino inativado), antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 50 µg/ml de gentamicina) e 1,5 mM de $NaHCO_3$, a 37 ºC, em incubadora de ar com 5% CO_2 e 95% de umidade. Para os experimentos, alíquotas de $2x10^7$ células/ml foram incubadas em placas de 24 poços, e colocadas sob condições específicas para cada experimento.

3.9. ESTIMULAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS HD11

A estimulação das culturas de células HD11 foi feita com 1µg/ml de LPS diluído em DMEM-F12. Em seguida, o meio será retirado das placas de cultura, e separado para análise da produção de NO, aferida através da medição dos níveis de seu metabólito nitrito. Além disso, foram realizados experimentos com estimulação das células por *P. gallinaceum* obtidos de sangue de aves infectadas. Dentre estes, foram realizados experimentos e ainda, o padrão de expressão da enzima NOS, nas células estimuladas e não-estimuladas (descrito posteriormente).

3.10. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Após a estimulação das células HD11 cultivadas em garrafas de cultura e ativadas com LPS, o meio foi removido, as células lavadas duas vezes com PBS gelado e colocadas sobre o gelo (4 ºC). Foi adicionado 0,5 ml por garrafa de tampão RIPA+ (Tris HCL 10 mM pH 7,5; desoxicolato de sódio 10 mM; Triton X-100 1%; SDS 0,1%) e as células incubadas por 10 minutos nesta temperatura sob agitação. O lisado, após ser centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos, teve seu sobrenadante

aliquotado e estocado a -80ºC. As proteínas do lisado foram quantificadas com kit para detecção de proteínas.

3.11. SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE

A separação de proteínas é feita através de sua carga elétrica, pela técnica de eletroforese. Moléculas com carga negativa irão migrar para o polo positivo e moléculas com carga positiva irão migrar para o polo negativo mediante a aplicação de uma corrente elétrica. A mobilidade eletroforética tem influência sobre a carga proteica no meio eletroforético (SILVA *et al.,* 2002).

A eletroforese precisa de determinados padrões como, por exemplo, uma corrente elétrica previamente padronizada, assim como uma diferença de potencial elétrico, potência e o pH das soluções envolvidas na reação. Entretanto para possíveis purificações proteicas estabelece-se uma corrente de 30 mA e uma voltagem, que pode variar até 100 volts (RETAMAL *et al*., 1999). Eletroforese em gel de Poliacrilamida é amplamente utilizada para separação de proteínas a partir de amostras complexas (O'FARRELL, 1975).

A eletroforese em duas dimensões (2D) separa as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico. As proteínas são primeiramente separadas em um gel unidimensional 1D e, após essa separação por massa molecular, as proteínas sofrerão uma segunda separação. A segunda etapa da eletroforese 2D é a Focalização Isoelétrica (IEF), que tem como objetivo a determinação de um ponto isoelétrico de uma proteína, e o gradiente de pH é estabelecido no gel com moléculas orgânicas que são anfóteras e de baixo peso molecular que sofrem a ação de um campo elétrico. Então a mistura proteica é aplicada para que a proteína migre até atingir um pH adequado que coincida com seu ponto isoelétrico. As proteínas migram até que elas consigam alcançar uma posição em que a sua carga seja neutra ou em repouso. A eletroforese 2D é uma excelente ferramenta para separar proteínas com mesmo peso molecular, mas com pontos isoelétricos diferentes (ALFENAS et al., 1998).

3.12. ENSAIOS ELETROFORÉTICOS

3.12.1. Géis Unidimensionais

As amostras de células lisadas foram submetidas à eletroforese unidimensional em mini-géis de poliacrilamida (PAGE) SDS 10% (LAEMMLI, 1970) e nativo 7% (DAVIS, 1964) para análise do perfil protéico.

3.12.2. Géis Bidimensionais

As tiras de gel de poliacrilamida provenientes da eletroforese em primeira dimensão foram submetidas a géis bidimensionais nativo/SDS com 1D Nativo-PAGE 7% e 2D SDS-PAGE 10%, com agente redutor (β-mercaptoetanol).

3.13. BIOQUIMICA DA NADPH-DIAFORASE EM GEL

3.13.1. Detecção da atividade no gel

Os lisados foram submetidos a eletroforese unidimensional em géis Nativo-PAGE 7% e posteriormente foram cortadas tiras para que a atividade diaforásica fosse testada no gel.Para detectar a atividade diaforásica é necessário fazer uma solução de revelação com os seguintes reagentes: Tris-HCl (50 mM), NADPH (1 mM), NBT (0.4 mg/ml) e Triton X-100 (0.025%). Primeiramente a tira do gel deve ser lavada a cada 20 minutos por três vezes e depois devem ser colocadas na solução de revelação por 45 minutos em uma estufa a 37° C. Após este período o gel deve ser lavado com água destilada para evitar que a reação continue. As tiras serão então fotografadas e as bandas marcadas são evidencias de atividade diaforásica.

3.13.2. Quantificação da atividade no gel

A atividade de NADPH-d será realizada pelo método indireto, a partir do protocolo: adição de 15 mg de azul de nitrotetrazólio (NBT) a 0,5 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) (solução I). Posteriormente, será acrescentado 300 mg de ácido málico em 50 ml de solução de TRIS 0,05 M (solução II), ajustando-se então o pH para 8,0 . Em seguida, será acrescentado à solução II 50mg de β-NADP e 20 mg de cloreto de manganês. As soluções I e II serão então misturadas, acrescentando-se em seguida 1,5 ml de TRITON X-100 e adicionadas aos géis unidimensionais e bidimensionais nativo-nativo, nativo-SDS e SDS-SDS, com e sem β-mercaptoetanol.

Os géis nativo-SDS e SDS-SDS, antes de serem embebidos na solução de reação serão lavados com Triton X-100 2,5% por 12 horas e posteriormente com

água destilada por 4 horas, para retirada do SDS. Após 45 minutos de incubação em local escuro, os géis serão expostos à luz fraca para visualizar a reação enzimática.

3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação estatística dos resultados será utilizada a análise de variância (ANOVA) das médias amostrais seguida pelo tratamento com o pós-teste Tukey do programa BIOESTAT 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. SOBREVIDA E PARASITEMIA

O período de desenvolvimento do parasito na ave é entre 4-5 dpi, após o qual encontramos algumas formas parasitárias no sangue. Simultâneo ao aparecimento dessas formas surgem as primeiras manifestações da doença. Com o desenvolvimento do parasito, as formas tornam-se mais frequentes no sangue. Nossos resultados demonstram uma relação direta entre níveis elevados de parasitemia e morte do animal, no grupo não tratado com AG.

A taxa de mortalidade resultante da injeção intramuscular de $5x10^6$ eritrócitos parasitados com *Plasmodium gallinaceum*, precedida pelo tratamento com AG, foi avaliada em pequenos grupos de animais, em experimentos diferentes, totalizando n=32, em um período de 14 dias pós-infecção. Nossos resultados apontam variação na taxa de sobrevivência entre 12% e 25% nos animais não tratados e entre 62% e 75% nos animais tratados, com médias de 19% e 69%, respectivamente (Figura 6). A mortalidade foi observada entre os dias 5-14 pós-infecção, com maior número de mortes a partir do 8º dia. Animais que sobreviveram apresentaram regressão na parasitemia e patologia da doença.

Manifestações clínicas típicas da malária aviária, como apatia, falta de apetite, caquexia, palidez da crista e membros (indicativo de anemia), foram observadas, como descritas em trabalhos anteriores do nosso grupo. Importante ressaltar que o grupo tratado com AG apresentou manifestações clínicas mais brandas.

4.2. NÍVEIS DE NITRITO/NITRATO NO PLASMA DE ANIMAIS INFECTADOS COM *P. gallinaceum* TRATADOS OU NÃO COM AMINOGUANIDINA

A medição de nitrito/nitrato no plasma mostra valores basais desses metabólitos do NO em animais normais e após infecção antes do aparecimento de parasitos no sangue. Quando dosado em plasma de animais com parasitemia superior a 10%, se observa aumento nos níveis desses metabólitos, indicando relação da malária com ativação da enzima iNOS (Figura 7). No entanto, mesmo em

alta parasitemia, este aumento não é tão evidente nos animais tratados com AG (Figura 7), o que reforça o envolvimento da isoforma induzida da NOS.

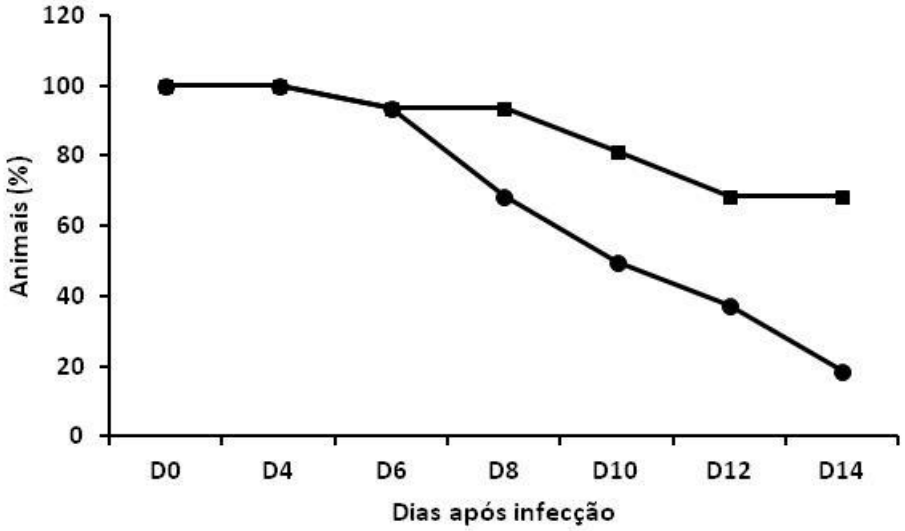

Figura 6. Taxa de sobrevida de animais infectados com *Plasmodium gallinaceum* tratados (■) ou não (●) com aminoguanidina.

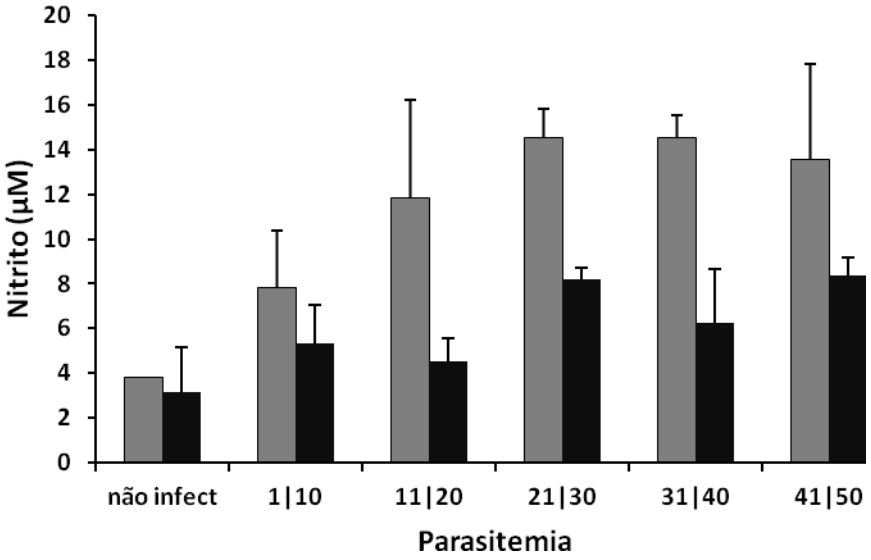

Figura 7. Níveis de nitrito no plasma de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* tratadas (barras escuras) ou não (barras claras) com aminoguanidina, agrupadas por intervalos de parasitemia.

4.3. NÍVEIS DE NITRITO EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE ANIMAIS INFECTADOS COM *P. gallinaceum* TRATADOS OU NÃO COM AMINOGUANIDINA

Após investigar a produção de óxido nítrico no plasma dos animais infectados tratados ou não com AG, analisamos a produção de nitrito em macrófagos como um sub produto da ativação da isoforma induzida da NOS. Macrófagos quando estimulados por LPS têm a produção de NO aumentada. Dessa forma, analisamos a produção por macrófagos, estimulados ou não com LPS, de cada grupo estudado (não infectado e infectado, tratados ou não com AG, em diferentes parasitemias).

Os valores de nitrito dos macrófagos obtidos no grupo não infectado foram 0,39 e 0,41 μM nos animais tratados e não tratados com AG, respectivamente (Figuras 8A e 8B). Nos macrófagos estimulados com LPS, os níveis foram 1,36 e 0,46, nos animais tratados e não tratados com AG, respectivamente (Figuras 8A e 8B). Observamos ainda que os macrófagos estimulados com LPS obtidos dos animais tratados com AG não apresentaram um aumento na produção de NO em relação ao macrófago sem estimulação, como ocorre nos animais não tratados (Figura 8B). Este fato foi observado nas parasitemias mais baixas. Com parasitemias mais elevadas, os macrófagos estimulados com LPS mostram um aumento na produção de nitrito (Figura 8B), no entanto, inferior ao visto nos animais não tratados com AG (Figura 8A).

A produção de nitrito foi proporcional ao aumento da parasitemia nos animais infectados não tratados com AG, o que sugere um aumento na atividade da enzima iNOS em consequencia ao quadro de infecção. No entanto, podemos observar, na Figura 8C, que animais tratados com AG, com parasitemia superior a 30%, apresentaram níveis de nitrito aproximadamente 60% menor que os animais não tratados no mesmo intervalo de parasitemia, sugerindo inibição da isoforma induzida da NOS pela AG.

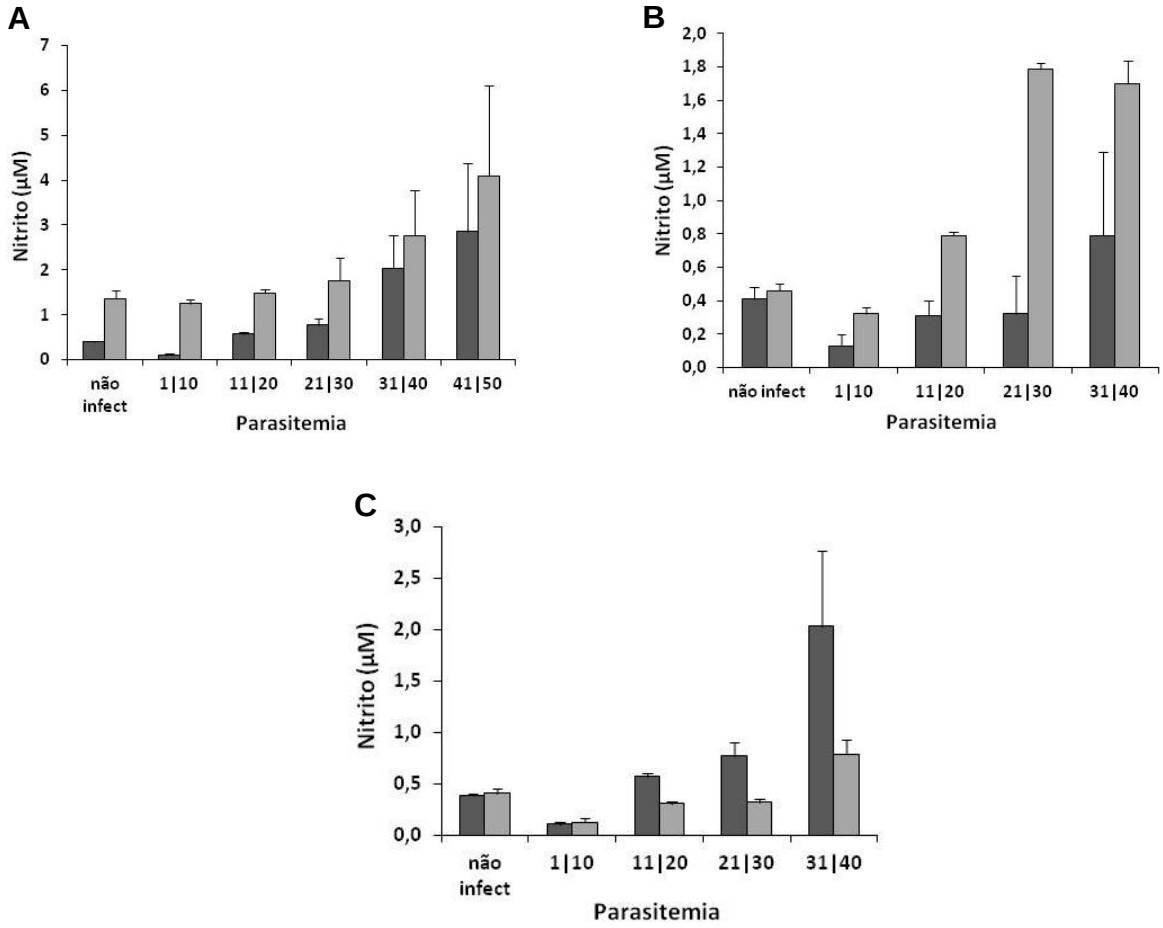

Figura 8. Produção de óxido nítrico por macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum*. Em **A**, animais não tratados com AG, e em **B**, animais tratados com AG (barras escuras, macrófagos sem LPS, e barras claras, macrófagos com LPS). Em **C**, macrófagos sem LPS de animais não tratados (barras escuras) e tratados (barras claras) com aminoguanidina.

4.4. NÍVEIS DE NITRITO EM CÉLULAS HD11 ESTIMULADAS OU NÃO COM LPS

Os resultados com células HD11 estimuladas e não-estimuladas com LPS, demonstram elevada produção de nitrito nas células estimuladas em contraste com as células não-estimuladas. As células tratadas com LPS apresentaram uma alta concentração de nitrito, o que sugere a ativação das células HD11 pelo LPS, e ainda, que a ativação destas células aumenta a expressão de iNOS, com produção elevada de NO e, consequentemente, de seus metabólitos como o nitrito.

As células que não receberam tratamento com LPS mostraram uma concentração basal de nitrito de 0,69 µM ± 0,13, enquanto que as células tratadas com LPS mostraram um aumento significativo na produção de nitrito, alcançando uma concentração de 92 µM ± 1,1 (Figura 9).

4.5. PROTEÍNAS APÓS ELETROFORESE EM GEL SDS/PAGE 1D

A Figura 10 mostra um gel SDS/PAGE (1D), onde as células foram tratadas ou não com 1 µg/ml de LPS. O gel SDS/PAGE é importante para observar o padrão das bandas proteicas de acordo com seu peso molecular. Analisando as bandas pode-se observar que possuem padrões semelhantes. Porém, o gel com as células tratadas com LPS, apresentou uma banda proteica, que possui um peso molecular em torno de 130 kDa, o que não foi observado nas células não tratadas, onde a marcação está menos acentuada.

Na Figura 6, observamos maior concentração de nitrito em células tratadas com LPS, portanto pode-se inferir que a banda proteica com marcação mais acentuada, encontrada na amostra de células tratadas com LPS possa ser a iNOS. Em mamíferos o peso molecular da iNOS é em torno de 130 kDa. Sabe-se que os pesos moleculares da iNOS de aves e mamíferos são semelhantes, assim, para testar a hipótese de que a banda encontrada nas células tratadas é a iNOS, foi realizada uma marcação para NADPH-diaforase em gel Nativo/PAGE.

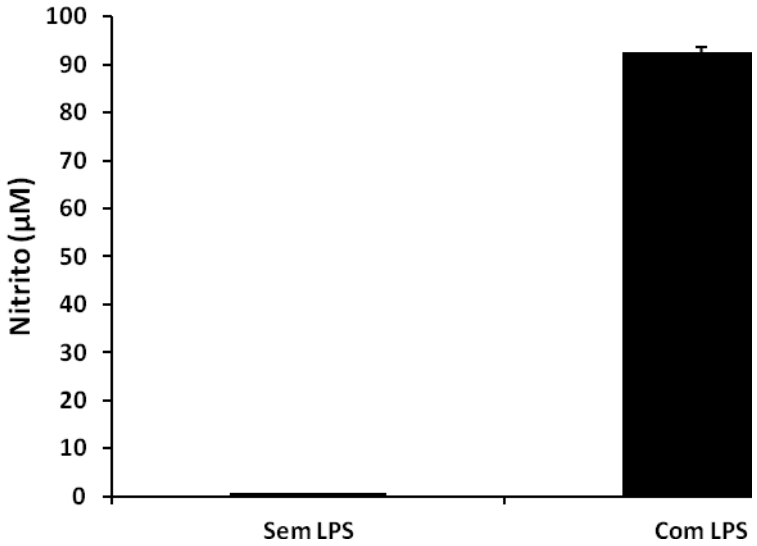

Figura 9: Produção de Óxido Nítrico em células HD11 cultivadas após estimulação ou não com LPS. Foram feitas três amostras diferentes para cada grupo, em triplicata.

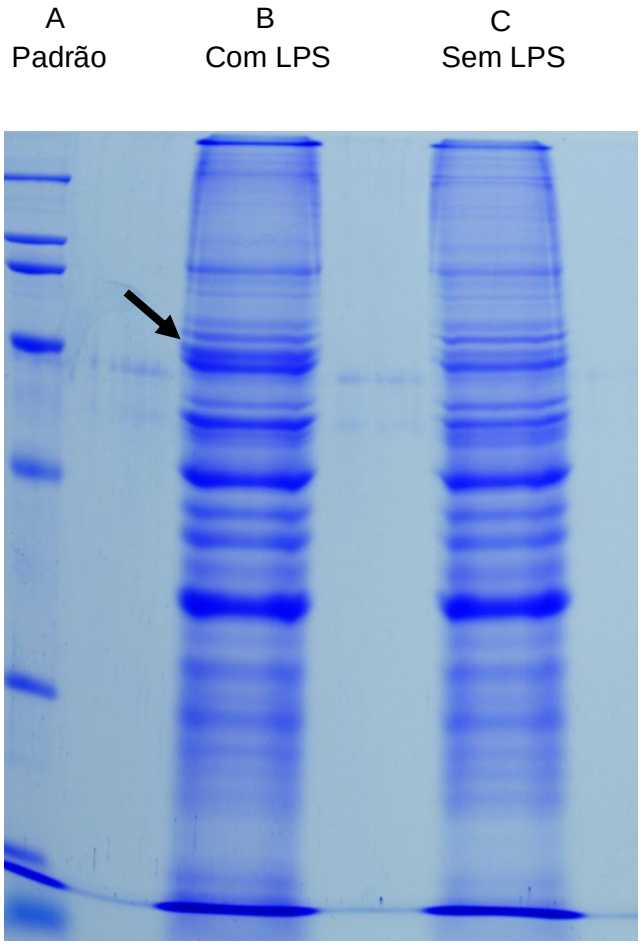

Figura 10. Gel de eletroforese SDS/PAGE 10% 1D para células HD11 tratadas e não tratadas com LPS. Em (A) é a amostra padrão. Em (B) proteínas presentes em cultura de células HD11 tratadas com 1 µg/ml de LPS. A seta aponta a proteína com 130.000 daltons. Em (C) proteínas presentes em cultura de células HD11 sem nenhum tipo de tratamento.

4.6. ATIVIDADE DA NADPH-DIAFORASE EM GEL NATIVO/PAGE

A iNOS é uma enzima que apresenta atividade diaforásica e para observar tal atividade em gel foi feito um gel Nativo/PAGE com β-mercaptoetanol e sem SDS. Após 24 horas na estufa a 37° C e 5% de CO_2 as células, tratadas ou não com LPS, foram colocadas em uma solução contendo inibidores de proteases e tampão de lise para que fosse feita a dosagem proteica. Após a dosagem proteica as amostras foram processadas para que fossem colocadas no gel Nativo/PAGE. Para a eletroforese do gel Nativo/PAGE é necessário coloca-lo a uma temperatura de 4° C. Após término da corrida, o gel foi colocado em uma solução de revelação para atividade diaforásica (Figura 11).

No grupo de células tratadas com LPS pode-se observar uma marcação para atividade diaforásica na banda que possui em torno de 66 kDa (Figura 11A). No grupo de células não tratadas com LPS não observamos marcação para atividade diaforásica (Figura 8B).

4.7. PROTEÍNAS APÓS ELETROFORESE EM GEL SDS/PAGE 2D

Eletroforese em duas dimensões (2D) foi realizada para a separação de proteínas através de seu ponto isoelétrico, a partir de uma mistura complexa de proteínas obtidas de células tratadas com LPS. Esse procedimento é necessário para separar proteínas com a mesma massa molecular, o que traria conflitos para o processo de purificação.

A amostra de células HD11 tratadas com LPS foi colocada em gel 1D Nativo/PAGE, que foi corado em seguida com tampão de amostra por 30 minutos, para posterior corrida em gel SDS (10%)/PAGE para que ocorresse a separação proteica por ponto isoelétrico.

Nossos resultados para eletroforese 2D mostram marcação para proteínas com ponto isoelétrico semelhante a uma proteína com 65 kDa (Figura 12).

Figura 11: Marcação para NADPH-diaforase em gel de eletroforese Nativo/PAGE para células HD11 tratadas ou não com LPS. Em (A) proteínas presentes em cultura de células HD11 tratadas com 1 µg/ml de LPS. A seta mostra marcação para uma proteína com 66 kDa. Em (B) proteínas presentes em cultura de células HD11 sem nenhum tipo de tratamento e sem nenhuma marcação diaforásica.

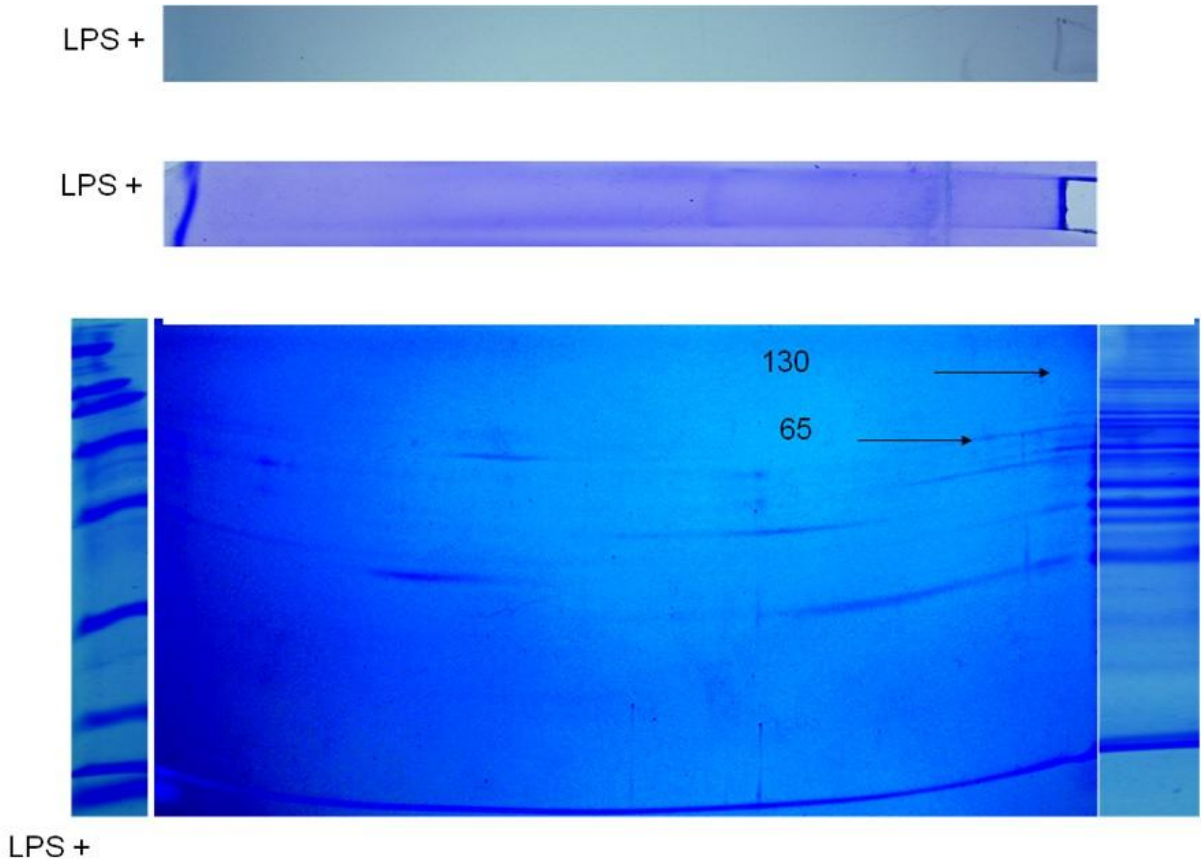

Figura 12: Gel de eletroforese em 2D para células HD11 tratadas ou não com LPS. Presença de banda proteica em torno de 65 kDa, enquanto que em 130 kDa não há evidência de proteína.

Na análise em géis unidimensionais e bidimensionais o padrão de expressão de proteínas também se mostra diferente em relação aos diferentes tratamentos celulares (Figura 13).

Conforme análise dos géis unidimensional nativo e bidimensionais observamos um padrão de expressão diferente nas células estimuladas e não-estimuladas. Observamos ainda, nas células estimuladas, a expressão aumentada de uma proteína com peso molecular em torno de 116 kDa. Diante da produção de nitrito aumentada nas células estimuladas, podemos inferir que a proteína com maior expressão possa ser a NOS.

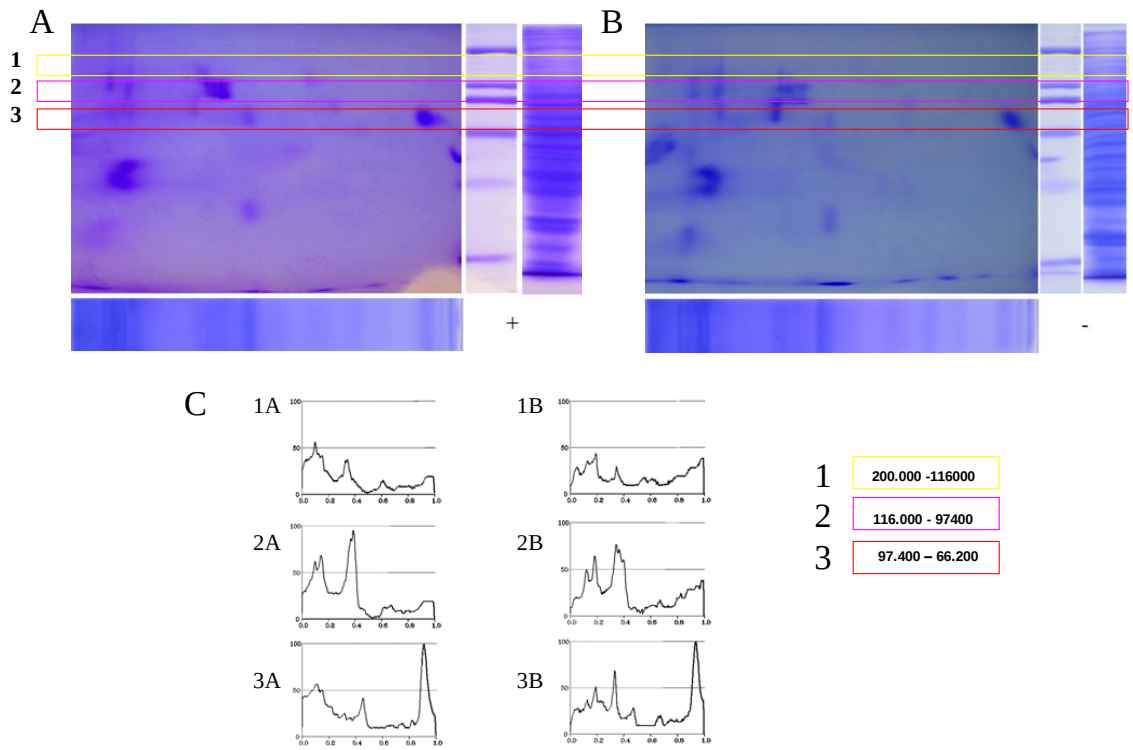

Figura 13: Análise do gel bidimensional SDS-PAGE 10% de macrófagos HD11 estimulados e não-estimulados com LPS. Em A, gel bidimensional de macrófagos HD11 estimulados e em B, gel bidimensional de macrófagos HD11 não-estimulados. Em C, quantificação dos picos protéicos nos géis das células estimuladas e não-estimuladas com LPS.

5. DISCUSSÃO

Devido à complexidade da fisiopatologia da malária, apesar de vários estudos realizados e acúmulos de dados, muitos aspectos envolvidos no desenvolvimento da doença ainda necessitam de esclarecimentos. Nesse contexto, modelos de estudos em malária têm sido desenvolvidos em macacos, ratos e camundongos, e embora nenhum deles reproduza exatamente a malária humana, diferentes modelos mostram certos aspectos comuns com a infecção humana (LANGHORNE, 1994).

Dentre esses modelos experimentais podemos destacar alguns utilizados no estudo de malária com ou sem envolvimento cerebral. Por exemplo, *P. knowlesi* e *P. coatneyi* em macacos cynomolgus são modelos de estudos em malária, porém em macacos Rhesus induzem malária cerebral, e ainda a infecção por *P. coatneyi* nesses macacos reproduzem características comumente associadas com a patologia cerebral humana. Outro modelo experimental bastante utilizado e crucial para o entendimento de eventos moleculares que levam a patologia cerebral é o modelo murino produzido pelo *P. berghei* (descoberto em 1948). Grande número de espécies murinas é utilizado para estudos, mas somente o *P. berghei* (cepas ANKA e K173) é responsável pelo seqüestro da microvasculatura, e causa malária cerebral (DE SOUZA & RILEY, 2002).

Modelos aviários foram os primeiros modelos para a doença em humanos, e no período entre 1890 e 1940 tornaram-se bases dominantes de pesquisas envolvendo biologia do parasito, imunologia da malária e pesquisas quimioterápicas. De todos os parasitos de aves, quatro espécies descobertas entre 1930 e 1940, destacam-se com maior relevância em estudos de malária: *P. relictum, P. cathemerium, P. gallinaceum* e *P. lophurae* (SLATER, 2005).

Malária aviária em *Gallus gallus* infectados com *P. gallinaceum* pode ser considerada um importante modelo para estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença como para desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (GARNHAM, 1966; KRETTLI *et al.*, 2001; PERMIN & JUHL, 2002; WILLIAMS, 2005; MACCHI *et al.*, 2010). É interessante ressaltar que em vários momentos durante a evolução da doença encontramos aspectos que são semelhantes aos encontrados em outros modelos experimentais, inclusive com os da malária humana.

Como um dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença é a resposta imunológica, com produção de mediadores como o NO (CLARK *et al.*, 1991;

LANGHORNE, 1994; KELLER *et al.*, 2004), este trabalho demonstrou a infecção experimental de galinhas por *P. gallinaceum* após tratamento *in vivo* com AG, inibidor da produção de NO, ressaltando sobrevida e produção de NO no plasma e por macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico. O presente trabalho também visa encontrar a enzima iNOS em macrófagos de galinha (linhagem HD11) para posterior uso no modelo aviário, uma vez que não existem marcadores específicos para aves.

Trabalhos anteriores (PERMIN & JUHL, 2002; WILLIAMS, 2005; MACCHI *et al.*, 2010; MACCHI *et al.*, 2013) demonstraram sintomas clínicos clássicos de malária, além de alta mortalidade de galinhas durante a infecção experimental por *P. gallinaceum*. Macchi *et al.* (2010) demonstraram lesões patológicas no cérebro desses animais e ainda ativação do sistema imunológico detectada pela produção de NO por macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico.

O presente estudo mostrou maior taxa de sobrevivência do grupo tratado com AG em relação ao grupo não tratado, o que enfatiza a importância da produção do NO na patogênese da doença. Nossos resultados sugerem envolvimento do NO na potencialização do quadro inflamatório da infecção malárica, que leva a morte, observada nos animais não tratados com AG, corroborando trabalhos anteriores em camundongos (GHIGO *et al.*, 1995, RUDIN *et al.*, 1997; FAVRE *et al.*, 1999) e em galinhas (MACCHI et al., 2010; 2013), e ainda, em observação de cérebros *post mortem* de malária fatal por *P. falciparum* (MANEERAT *et al*., 2004. Esses resultados fortalecem ainda mais o modelo aviário, indicando similaridade entre os modelos estudados com diferentes hospedeiros e espécies de *Plasmodium*.

Quando comparamos nossos resultados com resultados de estudos em camundongos, diferenças são encontradas quanto ao período do aparecimento da parasitemia e consequente desenvolvimento da doença. O nosso modelo mostra uma ação mais rápida do parasito em relação à infecção por *P. berghei* (CARVALHO *et al*., 2000; WASSMER *et al*., 2003). Carvalho *et al*. (2000) observaram o desenvolvimento da doença em camundongos CBA/j infectados com *P. berghei* ANKA a partir do 8° dia de infecção, portanto um pouco mais tarde comparado com nossos resultados. Outros estudos demonstram que cerca de 80% dos camundongos infectados com *P. berghei* desenvolvem a malária cerebral entre o 9° e o 14° dia de infecção (BELNOUE *et al*., 2003). Nossos resultados demonstram que cerca de 80% dos animais infectados morrem durante o período

crítico da doença, enquanto animais infectados tratados com AG apresentam taxa de mortalidade de cerca de 20%, corroborado por MACCHI *et al.* (2010) que demonstraram um índice de mortalidade >90% em animais infectados sem qualquer tipo de tratamento. Em 2013, MACCHI *et al.*, mostraram mortalidade de 85% para animais infectados não tratados e cerca de 30% para animais tratados com AG, apesar de, nesses animais, a AG suprimir o sistema imunológico. Resultados semelhantes foram observados em um trabalho com *P. relictum* em canários tratados com AG (BICHET *et al.*, 2012).

Nossos resultados demonstram ainda níveis de nitrito aumentados no plasma de animais não tratados em relação aos animais tratados com AG. Conforme aumenta a parasitemia há aumento dos níveis de nitrito nos animais não tratados, o que não é mostrado em animais tratados com AG. Isso indica que o NO pode estar envolvido na alta mortalidade observada nos animais não tratados com AG.

O papel do NO na imunidade à malária já foi evidenciado, e é descrito com atividade antimicrobiana sobre o estágio eritrocítico assexuado do parasito da malária (TAYLOR-ROBINSON & SMITH, 1999). TAYLOR-ROBINSON (1997) observou que a ativação da via metabólica L-arginina-NO exerce um efeito antimicrobiano sobre *P. falciparum, P. berghei* e *P. chabaudi*. Ele mostrou que concentrações aumentadas de NO, possuem um efeito inibidor com posterior morte do parasito em seu estágio assexuado. Além disso, CLARK *et al*. (1993) observaram que o NO possui um papel de controlar a parasitemia primária, pois com seu efeito vasodilatador, leva a um seqüestro menos eficiente nos microcapilares, o que facilita a remoção por macrófagos. Esses resultados podem explicar os menores níveis de nitrito no plasma de animais tratados com AG com parasitemia elevada em relação animais não tratados também em parasitemia elevada, observados em nossos resultados.

No entanto, LEVESQUE *et al*. (1999) demonstraram uma relação inversa entre produção de NO e severidade da doença após observarem que níveis de nitrato no soro e na urina e níveis de antígenos iNOS em células mononucelares de sangue periférico em crianças com malária cerebral mostraram-se significativamente reduzidos em relação ao observado em crianças saudáveis. BOUTLIS *et al*. (2004) demonstraram em um estudo feito em Papua Nova Guiné, que produção de NO e atividade da NOS em crianças e adultos não tem associação com níveis de parasitemia. Observaram ainda que níveis basais da produção de NO e atividade da

NOS não possuem efeito protetor contra o parasito, o que contrasta estudos anteriores que demonstraram efeito antiparasítico para o NO. Fato corroborado por SOBOLEWSKI *et al*. (2005), que mostraram resistência à morte do *P. berghei* por espécies reativas de oxigênio, entre elas, o NO.

Apesar de evidenciado, o papel do NO ainda é bastante controverso dentro da infecção malárica, principalmente pelas várias isoformas de enzima e locais de produção (FÖRSTERMANN *et al.*, 19940. No entanto, a produção de NO pela isoforma induzida da enzima parece ter um papel de destaque dentro da infecção (CLARK *et al.*, 1991; GHIGO *et al.*, 1995; BOGDAN, 2001; BRUNET, 2001; MACCHI *et al.*, 2010; MACCHI et al., 2013). O NO produzido pelo sistema imunológico em resposta a infecção, potencializa o quadro de inflamação levando a maior ativação do endotélio, mediando assim a neurotoxicidade provocada pelo parasito na malária cerebral (HEARN *et al.*, 2000; HUNT & GRAU, 2003; MANEERAT *et al.*, 2004). Isso pode explicar a maior sobrevida em animais tratados com AG.

A resposta imune do hospedeiro é modulada pela liberação de componentes celulares após exposição patogênica. Uma ampla variedade de células é capaz de produzir NO, que desempenha papel chave na resposta inata a infecção, quando reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio atuam como moléculas efetoras para matar patógenos invasores (CRIPPEN et al., 2003). Macrófagos secretam grande quantidade e variedade de citocinas e outras biomoléculas com importância imunológica, dentre elas reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, geralmente produtos da indução por estas citocinas (MACMICKING *et al*., 1997; DIL & QURESHI, 2002; CRIPPEN *et al*., 2003). Em macrófagos o NO é produzido pela iNOS ativada geralmente pela resposta do sistema imune, durante um quadro de infecção (BRUNET, 2001) e é considerado importante mediador da função efetora de macrófagos. A maioria dos estudos para investigar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos quantificam seus metabólitos, tal como o nitrito, ou a expressão da NOS.

Macrófagos peritoneais e linhagens celulares de macrófagos de galinhas são conhecidos por produzir nítrico óxido (SUNG et al., 1991; HUSSEIN & QURESHI, 1997). Nesse contexto, investigamos a participação do NO produzido por macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de animais tratados e não tratados com AG.

Mostramos produção de metabolitos de óxido nítrico por monócitos após estimulação com LPS. Macrófagos obtidos de animais controles tratados ou não com AG demonstraram uma produção basal de nitrito quando comparado com macrófagos ativados com LPS. No entanto animais tratados com AG não tiveram valores aumentados em macrófagos ativados com LPS, sugerindo que nesses animais a iNOS está inibida pela AG. Nossos dados demonstram ainda um aumento gradativo na produção de NO em animais infectados conforme aumento da parasitemia. No entanto, isso não foi observado para animais tratados com AG, onde só em alta parasitemia apresentaram aumento dos níveis de nitrito, mas menor em relação aos animais não tratados. Esses resultados contrastam com resultados obtidos por BOUTLIS *et al*. (2003), que observaram baixa atividade da iNOS em células monocucleares de indivíduos adultos em Papua Nova Guiné, mas estão de acordo com MACCHI *et al.* (2010) que observaram aumento na produção de nitrito em animais infectados com *Plasmodium gallinaceum*, mas sem nenhum tipo de tratamento.

Outros achados que relacionam um aumento na atividade e expressão de iNOS com o desenvolvimento da malária cerebral humana e morte foram mostrados por WEISS *et al*. (1998). Estes resultados estão corroboram com os encontrados em nosso trabalho. A diferença encontrada entre os macrófagos derivados de monócitos ativados com LPS e aqueles sem estimulo com LPS de animais infectados tratados com AG sugere efeito sinérgico da estimulação com LPS e infecção malárica. No entanto, novos estudos relacionados a produção de NO precisam ser realizados para entender o mecanismo pelo qual isso ocorre.

Diante desse contexto, o trabalho investigou a ativação da isoforma iNOS em macrófagos de galinhas (HD11) visando obtenção dessa enzima purificada para posterior uso no modelo aviário, uma vez que não existem marcadores para o modelo.

A linhagem celular HD11 é um vírus da mielocitomatose de aves (MC29) transformada em macrófagos de galinha, que tem sido caracterizada por expressar fortemente receptores Fc, capacidade fagocítica e antígenos de superfície celular de macrófagos (BEUG *et al*., 1979). Células HD11 têm sido usadas em estudos *in vitro* de funções imunes de macrófagos de galinha (LILLEHOJ & LI, 2004; HE *et al*., 2011).

No presente estudo, os macrófagos de galinhas (células HD11) foram usados induzir a expressão de iNOS. Células HD11 produzem NO quando estimuladas com fatores antigênicos ou citocinas, como por exemplo, LPS de *Escherichia coli*. Essa ativação resulta ainda na liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios, incluindo a interleucina-12 e interferon (IFN), que permitem às células ativar respostas imunes (HAN *et al*., 2009).

O aumento na atividade e expressão de iNOS pode ser confirmada pela produção do metabólito nitrito nas células estimuladas com LPS, corroborando trabalhos anteriores que evidenciaram aumento na produção de NO apões diferentes estímulos (CRIPPEN *et al.*, 2003; CRIPPEN, 2006; HAN *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2011).

Após separação proteica em gel de eletroforese 1D, houve surgimento de uma banda proteica com peso molecular em torno de 130 kDa. A NOS cataliticamente activa é um homodímero de hemoproteína, em seu estado nativo (MARLETTA, 1993). O peso molecular varia de 110 kDa a 160 kDa, dependendo da isoforma e do animal (GHAFOURIFAR & RICHTER, 1997; GHAFOURIFAR *et al*., 1999). Quanto a forma induzida da NOS, algumas pesquisas chegaram a um valor de 130 kDa a partir da purificação da iNOS de macrófagos murinos (HEVEL *et al.,* 1991; STUEBR *et al.,* 1991).

Cada monômero da NOS contém um domínio oxidase na sua extremidade amino-terminal e um domínio redutase na sua extremidade carboxiterminal. O domínio redutase contém sítios de ligação para cofatores redox NADPH, FMN, FAD e CaM. Dois equivalentes redutores são transferidos do NADPH, via FMN e FAD, para o domínio da oxidase sob o controle do complexo Ca^{2+} / CaM. O domínio oxidase é o centro ativo da a reacção de oxidação (CAMPOS *et al.*, 1995; GROVES & WANG, 2000).

A enzima NOS é particularmente interessante e complicada devido a variedade de cofatores redox na atividade catalitica. CaM ativa NOS constitutiva por influenciar o seu dominio redutase. Nesse contexto, NADPH é o redutor de todas as reações da NOS (GROVES & WANG, 2000).

Estruturas formadas pela ligação do substrato a iNOS, eNOS e nNOS mostram que ambos se ligam perto do grupo heme por uma rede de hidrogênios. No entanto, essas estruturas formadas levantam as discussões envolvendo os

mecanismos das isoformas, mostrando as dificuldades de entendimento em alguns deles propostos (TIERNEY *et al*., 2000).

Nossos resultados após separação proteica por eletroforese 2D mostram proteínas com ponto isoelétrico semelhante a uma proteína com 65 kDa. De acordo com trabalhos anteriores (MARLETTA, 1993; GHAFOURIFAR & RICHTER, 1997; GHAFOURIFAR *et al*., 1999), a iNOS é um homodímero em sua forma nativa, assim, a proteína vista no gel 2D pode ser um monômero da iNOS produzida pelos macrófagos HD11 quando estimulados pelo LPS.

Atividade da NOS no cérebro de rato foi detectada primeiramente no prosencéfalo, onde muitos neurônios NADPH-diaforase positivos doram descritos (KNOWLES *et al.*, 1989). No cortex cerebelar as células granulares mostram atividade de NADPH-diaforase. No entanto, a reação é fraca, e as células granulares não são coradas por imuno-histoquímica utilizando anticorpo especifico para NADPH-diaforase. Este resultado sugere que o cerebelo possa conter uma isoforma diferente daquela constitutiva com 150 kDa (ROSS *et al*., 1990).

A NOS pode produzir NO numa forma dependente de NADPH, em resposta a alterações nas concentrações intracelulares de cálcio livre por conversão de arginina em citrulina (KNOWLES *et al.*, 1989). A coexistência seletiva de imunoreatividade com citrulina em neuronios NADPH-diaforase positivos é, portanto, consistente com o fato de NOS ser uma NADPH-diaforase (HOPE *et al*., 1991), e assim, ser detectada com a simples tecnica histoquímica e bioquímica da NADPH-diaforase.

Nossos resultados demonstram marcação para atividade diaforásica na banda protéica obtida por separação em gel de eletroforese Nativo/PAGE para células HD11 tratadas com LPS. A marcação está para uma proteína com cerca de 66 kDa. Como a iNOS é um dímero, sugere fortemente que essa banda proteica represente uma subunidade da proteína, ou seja, o monômero da iNOS.

Nesse contexto, novos experimentos devem ser realizados para confirmação do tamanho da proteína, bem como suas propriedades de NADPH-diaforase para posterior extração e purificação da isoforma iNOS, a partir de células HD11 estimuladas com LPS.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. O mediador químico óxido nítrico está envolvido na fisiopatologia da malária por *Plasmodium gallinaceum* em galinhas, pois em animais tratados com aminoguanidina (inibidor da isoforma induzida da óxido nítrico sintase) foi observado maior sobrevida, além de menores níveis de nitrito no plasma e em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico.

2. Linhagem de macrófagos de galinhas (células HD11) quando estimuladas com LPS mostram produção aumentada de óxido nítrico, inferindo aumento na expressão e atividade da isoforma induzida da óxido nítrico sintase.

3. Após separação proteica por gel de eletroforese, as células HD11 estimuladas com LPS mostram padrão de expressão proteica diferente das células não estimuladas, com aparecimento de uma banda proteica em torno de 130 kDa, que em gel de eletroforese 2D, mostra uma banda em torno de 66 kDa, com atividade de NADPH-diaforase, sugerindo ser um monômero da isoforma induzida da óxido nítrico sintase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. B.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. Tradução de Claúdia Reali e outros. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008 – 2ª tiragem. Pág: 23-24.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75: 639–653, 2004.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357; 593-615, 2001.

ALFENAS, A. C.(ed) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 574 p, 1998.

ANDERSON, G. D.; HAUSER, S. D; McGARITY, K.L.; BREMER, M.E. ISAKSON, P.C.; GREGORY, S. A. Selective inhibition of Cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J. Clin. Invest*., 97(11): 2672-2679, 1996.

BAEK, K. J.; THIEL B, A.; LUCASS, S.; STUEHR, D. Macrophage Nitric Oxide Synthase Subunits:Purification, Characterization, And Role Of Prosthetic Groups And Substrate In Regulating Their Association Into A Dimeric Enzyme. *The Journal Biological Chemistry*, 268 (28) 21120 – 21129, 1993.

BERENDT AR, TURNER GDH, NEWBOLD CL. Cerebral Malaria: The Sequestration Hypothesis. *Parasitology Today*, 10: 412-414, 1994.

BEUG H, KIRCHBACH A, DODERLEIN G, CONSCIENCE JF, GRAF T. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. Cell 18: 375–90, 1979.

BICHET C, CORNET S, LARCOMBE S, SORCI G. Experimental inhibition of nitric oxide increases *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) parasitaemia. *Experimental Parasitology*, 132(4): 417-423, 2012.

BOER R, ULRICH WD, KLEIN T, MIRAU B, HAAS S, BAUR I. The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Molecular Pharmacology*, 58:1026-1034, 2000.

BOGDAN C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2: 907-916, 2001.

BREDT DS, SNYDER SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Review Biochemical,* 63*:*175-195*, 1994.*

BRUCE-CHWATT LJ. Historical outline. In: *Essential Malariology*. London: William Heinemann, p. 1-9, 1980.

CAMPOS KL, GIOVANELLI J, KAUFMAN S. Characteristics of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of arginine to N-hydroxyarginine, the first oxygenation step in the enzymic synthesis of nitric oxide. J Biol Chem 270: 1721-1728, 1995.

CLARK IA, AL YAMAN FM and JACOBSON LS. The biological basis of malaria disease. *International Journal for Parasitology*, 27(10): 1237-1249, 1997.

CLARK IA, COWDEN WB. The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacology Therapy*, 99: 221-60, 2003.

CLARK IA, ROCKETT KA and COWDEN WB. Proposed link between cytokines, nitric oxide and human cerebral malaria. *Parasitology Today*, 7(8): 205-207, 1991.

COBAN C, ISHII KJ, KAWAI T, HEMMI H, SATO S, UEMATSU S, YAMAMOTO M, TAKEUCHI O, ITAGAKI S, KUMAR N, HORII T and AKIRA S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by malaria pigment hemozoin. *The Journal of Experimental Medicine*, 201: 19-25, 2005.

COBAN, C.; ISHII, K. J.; UEMATSU, S.; ARISUE, N.; SATO, S.; YAMAMOTO, M.; KAWAI, T.; TAKEUCHI, O.; HISAEDA, H.; HORII, T.; AKIRA, S. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *International Immunology*, 19(1): 67-79, 2006.

CORBETT JA, MCDANIEL ML. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Methods in Enzymology*, 268: 398-408, 1996.

CUZZOCREA, S.; McDONALD, M. C. ; SIRIWARDENA, D.; SERRAINO, I.; DUGO, L.; BRITTI, D.; MAZZULLO, G.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Calpain Inhibitor I Reduces the Development of Acute and Chronic Inflammation. *American Journal of Pathology,* 157:No. 6, 2000.

DANIEL-RIBEIRO CT, FERREIRA-DA-CRUZ MF. The new and the old malaria immunopathology. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, 52: 269-281, 2000.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Method end Application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121: 404-427, 1964.

DE SOUZA JB, RILEY EM. Cerebral Malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection*, 4: 291-300, 2002.

DEROUICH-GUERGOUR D, BRENIER-PINCHART MP, AMBROISE-THOMAS P, PELLOUX H. Tumour necrosis factor a receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections**.** *International Journal for Parasitology*, 31: 763-769, 2001.

DIETRICH JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *Journal of Neuroimmunology*, 128: 58-68, 2002.

DWYER MA, BREDT DS, SNYDER SH. Nitric oxide synthase: irreversible inhibition by L-Ng-Nitroarginine in brain *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176: 1136-1141, 1991.

ESCALANTE AA, AYALA FJ. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA,* 91:11373-11377, 1994.

FAVRE N, RYFFEL B, RUDIN W. Parasite killing in murine malaria does not require nitric oxide production. *Parasitology*, 118: 139-43, 1999.

FÖRSTERMANN U, CLOSS EI, POLLOCK JS, NAKANE M, SCHWARZ P and KLEINERT H. Nitric oxide synthase isoenzymes: characterization, molecular cloning and functions. *Hypertension*, 23: 1121-1131, 1994.

FREVERT U, SPÄTH GF, YEE H. Exoerythrocytic development of *Plasmodium gallinaceum* in the white leghorn chicken. *International Journal of Parasitology*, 38:655–672, 2008.

FURCHGOTT RF and ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376, 1980.

GARNHAM PCC. Malaria Parasites and Other Haemosporidia. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford. 1966.

GHAFOURIFAR P, RICHTER C. Nitric oxides synthase activity in mitochondria. FEBS Lett 418: 291-296, 1997.

GHAFOURIFAR P, SCHENK U, KLEIN SD, RICHTER C. Mitochondrial nitric oxide synthase stimulation causes cytochrome C release from isolated mitochondria — evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. J Biol Chem 274: 31185-31188, 1999.

GHIGO D, TODDE R, GINSBURG H, COSTAMAGNA C, GAUTRET P, BUSSOLINO F, ULLIERS D, GIRIBALDI G, DEHARO E, GABRIELLI G, PESCARMONA G and BOSIA A. Erythrocyte stages of *Plasmodium falciparum* exhibit a high nitric oxide synthase (NOS) activity and release an NOS-inducing soluble factor. *Journal Experimental Medicine*, 182: 677-688, 1995.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol*, 3:23-35, 2003.

GORDON, S. Pattern Recognition Receptors: Minireview Doubling Up for the Innate Immune Response. *Cell* 111(7) 927-930, 2002.

GREEN SJ, SCHELLER LF, MARLETTA MA, SEGUIN MC, KLOTZ FW, SLAYTER M, NELSON BJ and NACY CA. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens**.** *Immunology Letters*, 43: 87-94, 1994.

GREENBERG J, TREMBLEY HL, COATNEY GR. Effects of drugs on *Plasmodium gallinaceun* infections produced by decreasing concentrations of a sporozoite inoculum. *American Journal Epidemiology*, 51:194–199, 1950.

GRIFFITH, O. W. & STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol*. 57:707–736, 1995.

GROVES JT, WANG CCY. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. Current Opinion in Chemical Biology 4: 687–695, 2000.

GUILLERMO, L. V.; DaMATTA, R. A. 2004. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poultry Science*, 83:776-782.

GUTSCHOW, M. V.; HUGHEY, J. J.; RUGGERO, N. A.; BAJAR, B. T.; VALLE, S. D.; COVERT, M. W. Single-Cell and Population NF-κB Dynamic Responses Depend on Lipopolysaccharide Preparation. *Plos One*, 8 (1) 1-8, 2013.

HALDAR K, HILLER NL, van OOIJ C, BHATTACHARJEE S. *Plasmodium* parasite proteins and the infected erythrocyte. *Trends in Parasitology*, 21: 402-403, 2005.

HAN Y, NIU M, AN L, LI W. Upregulation of proinflammatory cytokines and NO production in BV-activated avian macrophage-like cell line (HD11) requires MAPK and NF-κB pathways. International Immunopharmacology 9: 817–823, 2009.

HE H, GENOVESE KJ, KOGUT MH. Modulation of chicken macrophage effector function by TH1/TH2 cytokines. Cytokine 53: 363–369, 2011.

HE, H. & KOGUT, M. H. CpG-ODN-induced nitric oxide production is mediated through clathrin-dependent endocytosis, endosomal maturation, and activation of

PKC, MEK1/2 and p38 MAPK, and NF-κb pathways in avian macrophage cells (HD11). *Cellular Signalling*, 15:911-917, 2003

HEARN J, RAYMENT N, LANDON DN, KATZ DR and DE SOUZA JB. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infection and Immunity*, 68: 5364-5376, 2000.

HEDDINI A. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. *International Journal for Parasitology*, 32: 1587-1598, 2002.

HEVEL, J. M.; WHITE, K. A.; MARLETTA, M. A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 22789 – 22791, 1991.

HOBBS MR, UDHAYAKUMAR V, LEVESQUE MC, BOOTH J, ROBERTS JM, TKACHUK AN, POLE A, COON H, KARIUKI S, NAHLEN BL, MWAIKAMBO ED, LAL AL, GRANGER DL, ANSTEY NM, WEINBERG JB. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet*, 360: 1468-1475, 2002.

HOPE BT, MICHAEL GJ, KNIGGE KM, VINCENT SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase (endothelium-derived relaxing factor/arginine/citrilline/cGMP). Proc. Nati. Acad. Sci. USA 88: 2811-2814, 1991.

HUANG, M.; ZHANG, S. E.; ZHANG, M. Effects of polysaccharides from *Morchella conica* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Applied Microbiology Biotechnology*, 94:763-771, 2012. DOI 10.1007/s00253-011-3711-7.

HUFF CG, PIPKIN AC, WEATHERSBY AB, JENSEN DV. The Morphology and Behavior of Living Exoerythrocytic Stages of *Plasmodium gallinaceum* and *P fallax* and Their Host Cells. J. *Biophysical and Biochemical Cytology*, 7:93-108, 1960.

HUNT NH and GRAU GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in Immunology*, 24:491-499, 2003.

HUSSEIN I, QURESHI M. Nitric oxide synthase activity and mRNA expression in chicken macrophages. Poult Sci 76: 1524–30, 1997.

IGNARRO LJ, BUGA GM, BYRNS RE, WOOD KS, CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacology properties

as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*, 246: 218 – 226, 1988.

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE and CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9265-9269, 1987.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Journal of the American Heart Association* 16: 477-483, 1990.

JANEWAY, C. A. J. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today* 13:11–16, 1992.

KIRCHGATTER K, DEL PORTILLO HA. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77: pags? - Rio de Janeiro, 2005.

KNOWLES RG, PALACIOS M, PALMER RM, MONCADA S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(13): 5159–5162, 1989.

KREMSNER P G, WINKLER S, WILDLING E, PRADA J, BIENZLE U, GRANINGER W, NÜSSLER A K. High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(1) 44 – 47, 1996.

KRETTLI AU, DANTAS LAB. Which routes do *Plasmodium* sporozoites use for successful infections of vertebrates? *Infection and Immunity*, 68: 3064-3065, 2000.

KRETTLI AU. *Plasmodium juxtanucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 14:235–245, 1972.

KRETTLI AU. The immune response to malaria sporozoite antigens in animal models and humans: A retrospective overview and present goals. *Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)*, 46(5/6), 1994.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in innate immune response. *Biocheministry Journal*. 420:1-16, 2009.

LEPENIES B, CRAMER J P, BURCHARD G D, WAGNER H, KIRSCHNING C J, JACOBS T. Induction of experimental cerebral malaria is independent of TLR2/4/9. *Med Microbiol Immunol*, 197: 39–44, 2008.

LIAN, L-H.; JIN, Q.; SONG, S-Z.; WU, Y-L.; BAI, T.; JIANG, S.; LI, Q.; YANG, N.; NAN, J-X. Ginsenoside Rh2 Downregulates LPS-Induced NF-κB Activation through Inhibition of TAK1 Phosphorylation in RAW 264.7 Murine Macrophage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

LILLEHOJ HS, LI G. Nitric oxide production by macrophages stimulated with Coccidia sporozoites, lipopolysaccharide, or interferon-gamma, and its dynamic changes in SC and TK strains of chickens infected with *Eimeria tenella*. Avian Dis 48: 244–53, 2004.

LOHARUNGSIKUL, S.; BLOMBERG, M. T.; AMOUDRUZ, P.; PICHYANGKUL, S.; YONGVANITCHIT, K.; LOOAREESUWAN, S.; MAHAKUNKIJCHAROEN, Y.; SARNTIVIJAI, S.; KHUSMITH, S. Expression of Toll-like receptors on antigen-presenting cells in patients with *falciparum* malaria. *Acta Tropica* 105: 10-15, 2008.

LUGER, R.; VALOOKARAN, S.; KNAPP, N.; VIZZARDELLI, C.; DOHNAL, A. M.; FELZMANN, T. Toll-Like Receptor 4 Engagement Drives Differentiation of Human and Murine Dendritic Cells from a Pro- into an Anti-Inflammatory Mode. *Plos One* 8(2) 1-13, 2013.

MACCHI B M, QUARESMA J A S, HERCULANO A M, CRESPO-LÓPEZ M E, DAMATTA RA, Do NASCIMENTO JLM. Pathogenic action of *Plasmodium gallinaceum* in chickens: Brain histology and nitric oxide production by blood monocyte-derived macrophages. *Veterinary Parasitology*, 172:16–22, 2010.

MACCHI BM, MIRANDA FLB, DE SOUZA FS, DE CARVALHO EC, ALBERNAZ AP, Do NASCIMENTO JLM, DAMATTA RA. Chickens treated with a nitric oxide inhibitor became more resistant to Plasmodium gallinaceum infection due to reduced anemia, thrombocytopenia and inflammation. *Veterinary Research*, 44(1):8. doi: 10.1186/1297-9716-44-8.

MAESHIMA, N. & FERNANDEZ, R. C. Recognition of lipid A variants by TLR-4-MD-2 receptor complex. *Cellular and Infection Microbiology***.** 2013.

MANEERAT Y, VIRIYAVEJAKUL P, PUNPOOWONG B, JONES M, WILAIRATANA P, PONGPONRATN E, TURNER G D, UDOMSANGPETCH R. Inducible nitric

oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. *Histopathology*, 37:269-277, 2000.

MARLETTA, M. A. Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(17): 12231 – 12234, 1993.

McCANN, S.M. The nitric oxide hypothesis of Brain aging. *Experimental Gerontology***,** 32: 431-440, 1997.

MCCUTCHAN TF, KISSINGER JC, TOURAY MG, ROGERS MJ, LI J, SULLIVAN M, BRAGA EM, KRETTLI AU, MILLER LH. Comparision of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: Biological and phylogenetic implications (*Plasmodium* apicomplexa evolution sporozoite invasion cell adhesion motif). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 11889-11894, 1996.

MEIS JFGM, VERHAVE JP. Exoerythrocytic development of malaria parasites. *Advanced Parasitology*, 27:1-61, 1988.

MENDIS K, SINA BJ, MARCHESINI P, CARTER R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 64: 97-106, 2001.

MITCHELL, J. A.; KOHLHAAS, K. L.; MATSUMOTO, T.; POLLOCK, J. S.; FORSTERMANN, U.; WARNER, T. D.; SCHMIDT, H. H.; MURAD, F. 1992. Induction of NADPH-dependent diaphorase and nitric oxide synthase activity in aortic smooth muscle and cultured macrophages**.** *Mol. Pharmacol*, 41:1163–1168.

MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43:109-142, 1991.

MOORE SA, SURGEY EG, CADWGAN AM. Malaria vaccines: where are we and where are we going? *Lancet Infectious Diseases*, 2:737-43, 2002.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol. Aspects Med,* 26:33-65, 2005.

O'FARRELL, P. H. High resolution twodimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry,* 250:4007-4021, 1975.

OMS. Organização Mundial da Saúde. www.oms.org, 2011.

OOI, E. H.; PSALTIS, A. J.; WITTERICK, I. J.; WORMALD, P. J. *Innate Immunity.* Otolaryngol Clin N Am (43) 473–487, 2010.

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Pattern recognition receptors and control of adaptative immunity. *Immunol Rev*, 227:221-233, 2009

PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327:524-526, 1987.

PARAENSE WL. Ações patogênicas das formas exo-eritrocitárias do *Plasmodium gallinaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 44:147–191, 1946.

PERKINS SL, SCHALL JJ. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology*, 88: 972–978, 2002.

PERMIN A and JUHL J. The development of *Plasmodium gallinaceum* infections in chickens following single infections with three different dose levels. *Veterinary Parasitology*, 105: 1-10, 2002.

PÓVOA MM, DA SILVA ANM, DOS SANTOS CCB, SEGURA MNO and MACHADO RLD. Malaria transmission. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, 52: 208-212, 2000.

QARI SH, SHI YP, PIENIAZEK NJ, COLLINS WE, LAL AA. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum***.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6:157–165, 1996.

RETAMAL, C.A.; THIEBAUT, P.; ALVES, E.W. Protein purification from polyacrilamyde gels by sonication extraction. *Anal. Biochem*. 268 (1): 15-20, 1999.

ROSS CA, BREDT D, SNYDER SH. Messenger molecules in the cerebellum. Trends Neurosci. 13(6): 216–222, 1990.

ROY SW, IRIMIA M. Origins of human malaria: rare genomic changes and full mitochondrial genomes confirm the relationship of *Plasmodium falciparum* to other mammalian parasites but complicate the origins of *Plasmodium vivax*. *Molecular Biology Evolutive*, 25:1192-1198, 2008.

RUDIN W, FAVRE N, RYFFEL B. Study of cerebral malaria using *Plasmodium berghei* and various knock-out mouse strains. *Immunology Letters*, 56: 424-pags., 1997.

SCHALL JJ. The ecology of lizard malaria. *Parasitology Today*, 6: 264-269, 1990.

SHAH, N. R.; NEHME-ALBITAR, S.; KIM, E.; MARR, N.; NOVIKOV, A.; CAROFF, M.; FERNANDEZ, R. C. Minor modifications to the phosphate groups and the C3’

acyl chain length of lipid A in two *Bordetella pertussis* strains, BP338 and 18-323, independently affect Toll-like receptor 4 activation*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology***.** Manuscript M112.434365, 2013.

SHINGADIA D and SHULMAN ST.Recognition and Management of Imported Malaria in Children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 11(3): 172-177, 2000.

SIDDALL ME, BARTA JR. Phylogeny of *Plasmodium* species: estimation and inference. *Journal of Parasitology*, 78, 567–568, 1992.

SILVA CLSP. Eletroforese Bidimensional: Princípios E Aplicações. *Ciências Agrárias e Saúde*, 2 (1) 74 – 78, 2002.

SILVA JC, EGAN A, FRIEDMAN R, MUNRO JB, CARLTON JM, HUGHES AL. Genome sequences reveal divergence times of malaria parasite lineages. *Parasitology*, 1:1-13, 2010.

SILVEIRA P, DAMATTA RA, DAGOSTO M. Hematological changes of chickens experimentally infected with *Plasmodium* (*Bennettinia*) *juxtanucleare*. *Veterinary Parasitology*, 162: 257-262, 2009.

SLATER LB. Malarial Birds: Modeling Infectious Human Disease in Animals. *Bulletin of the History of Medicine, 79:* 261-294, 2005.

SNOW RW, GUERRA CA, NOOR AM, MYINT HY, HAY SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434: 214-217, 2005.

STAINES HM, GODFREY EM, LAPAIX F, EGEE S, THOMAS S and ELLORY C. Two functionally distinct organic osmolyte pathways in *Plasmodium gallinaceum*-infected chicken red blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1561: 98-108, 2002.

STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258 (5090) 1898 – 1902, 1992.

STUEBR, D. J.; GROSS, S. S.; SAKUMA, I.; LEVI, R.; NATHAN, C. F. Activated murine macrophagus secrete a metabolite of arginine with the bioactivity ofendotelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med* 169:1011, 1989.

SU, C-L & AUSTIC, E. The Recycling of L-Citruline to L-Arginine in a Chicken Macrophage Cell Line. *Poultry Science* 78:353-355, 1999.

SUNG Y, HOTCHKISS H, AUSTIC R, DIETERT R. L-Argininedependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. J Leuk Biol 51: 49–56, 1991.

TA TANG TH, SALAS A, ALI-TAMMAM M, MARTÍNEZ MC, LANZA M, ARROYO E, RUBIO JM. First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malaria Journal*, 9:219-22, 2010.

TAKEDA, K. & AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, Vol. 17, No. 1, pp. 1–14, 2005.

TAYLOR-ROBINSON AW. The sequestration hypothesis: an explanation for the sensitivity of malaria parasites to nitric oxide-mediated immune effector function in vivo. *Medical Hypotheses*, 54(4): 638-641, 2000.

TAYLOR-ROBINSON, A. W. & SMITH, E. C. A role for cytokines in potentiation of malaria vaccines through immunological modulation of blood stage infection. *Immunological Reviews***,** 171(1) 105 – 123, 1999.

TIERNEY DL, HUANG H, MARTASEK P, ROMAN LJ, SILVERMAN RB, MASTERS BSS, HOFFMAN BM. ENDOR studies of L-arginine and N-G-hydroxy-L-arginine bound to all three holo-nitric oxide synthase isozymes. J Am Chem Soc 122: 5405-5406, 2000.

VALKÜNAS G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 pp.

VALKIUNAS G. Avian malaria parasites and other Haemosporidia. *CRC Press, Boca Raton*, FL, 936 p. 2005.

WAHLGREN M, CARLSON J, HELMBY H, HEDLUND I and TREUTIGER CJ. Molecular mechanisms and biological importance of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 323-329, 1992.

WAHLGREN M, FERNANDEZ V, SCHOLANDER C anD CARLSON J. Rosetting. *Parasitology Today*, 10: 73-79, 1994.

WASSMER SC, COMBES V and GRAU GE. Pathophysiology of cerebral malaria. Role of host cells in the modulation of cytoadhesion. *Annals New York Academy Science*, 992: 30-38, 2003.

WATERS AP, HIGGINS DG, MCCUTCHAN TF. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 88, 3140–3144, 1991.

WIDEMAN RF, BOWEN OT, ERF GF, CHAPMAN ME. Influence of aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on the pulmonary hypertensive response to microparticle injections in broilers. *Poultry Science*, 85:511-527, 2006.

WIDEMAN RF, ERF GF, CHAPMAN ME. N*ω*-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) Amplifies the Pulmonary Hypertensive Response to Microparticle Injections in Broilers. *Poultry Science*, 84:1077-1091, 2005.

WILLIAMS RB. The efficacy of a mixture of trimethoprim and sulphaquinoxaline against *Plasmodium gallinaceum* malaria in the domesticated fowl *Gallus gallus*. *Veterinary Parasitology*, 129: 193-207, 2005.

WU, J-Y. ; CHEN, C-H. ; WANG, C-H. ; HO, M-L. ; YEH, M-L. ; WANG, Y-H. Low-Power Laser Irradiation Suppresses Inflammatory Response of Human Adipose-Derived Stem Cells by Modulating Intracellular Cyclic AMP Level and NF-Kb Activity. *Plos One*,, 8 (1) 1-9, 2013.

ZHU, X.; PAN, Y.; LI, Y.; JIANG, Y.; SHANG, H.; GOWDA, D. C.; CUI, L. E.; CAO, Y. Targeting Toll-like receptors by chloroquine protects mice from experimental cerebral malaria. *International Immunopharmacology***,** 13(4): 392-7, 2012.

ZUO, D. C.; CHOI, S.; SHAHI, P. K.; KIM, M. Y.; PARK, C. G.; KIM, Y. D.; LEE, J.; CHANG, I. Y.; SO, I. E.; JUN, J. Y. Inhibition of pacemaker activity in interstitial cells of Cajal by LPS via NF-κB and MAP kinase. *World Journal Gastroenterology,* 19(8): 1210-1218, 2013.