

BARBARELLA DE MATOS MACCHI

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E HISTOPATOLÓGICAS
NO MODELO DE MALÁRIA AVIÁRIA *Gallus gallus* POR *Plasmodium
gallinaceum*: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

BELÉM-PARÁ
2011

BARBARELLA DE MATOS MACCHI

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E HISTOPATOLÓGICAS
NO MODELO DE MALÁRIA AVIÁRIA *Gallus gallus* POR *Plasmodium
gallinaceum*: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, área de concentração Biologia Celular, como requisito final para obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta

BELÉM-PARÁ

2011

BARBARELLA DE MATOS MACCHI

Alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas no modelo de malária aviária *Gallus gallus* por *Plasmodium gallinaceum*: papel do óxido nítrico

Banca examinadora:

Dr. José Luiz Martins do Nascimento (Orientador)
Instituto de Ciências Biológicas-UFPA

Dr. Renato Augusto DaMatta (Co-orientador)
Centro de Biociências e Biotecnologia-UENF

Dr. Sérgio Henrique Seabra
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde-UEZO

Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano
Instituto de Ciências Biológicas-UFPA

Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena
Instituto de Ciências Biológicas-UFPA

Dr. Givago da Silva Souza - Suplente
Instituto de Ciências Biológicas-UFPA

Belém, 28 de julho de 2011.

“De três maneiras se adquire a sabedoria: a primeira é pela reflexão, que é a mais nobre; a segunda, pela imitação, que é a mais simples; e a terceira é pela experiência, que é a mais amarga.”

Confúcio (551-479 a.C.)

“Muitas vezes, a causa principal da pobreza em ciência, é a riqueza presumida. A finalidade da ciência não é abrir a porta ao saber infinito. Mas colocar um limite à infinitude do erro.”

Bertold Brecht, in Galileu Galilei

*A todos aqueles que me amam,
A quem sem me amar, me aprecia,
A quem sem me apreciar, me respeita,
A quem sem me respeitar, me tolera,
A quem sem me tolerar, me recorda.*

A Deus,

*Aos meus amados pais, Luigi e Estelina,
As minhas irmãs Beatriz, Gigliola e Paloma,
A minha doce inspiração Fábio Monte...*

A todos os amigos incondicionais,

Pela companhia inesgotável

Em meu mar de sonhos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de pesquisa não é fruto de uma única pessoa, mas do esforço coletivo de pessoas e de instituições que a cercam. Esse não foi diferente, e a todos eu expresso meus agradecimentos mais sinceros, para que sintam-se co-autores desta pequena contribuição a ciência. Mas, como agradecer pode não ser tarefa fácil e nem justa, para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

*A **Deus**, fonte inesgotável de força e esperança, com as quais eu pude continuar a longa e árdua jornada, onde a distância tornou-se a principal vilã. Muitas vezes Tu me puseste a prova e eu fraquejei, mas, aprendi a confiar mais em Ti.*

*Ao meu orientador **Prof. José Luiz Martins do Nascimento**, que na grandeza de sua generosidade, concede oportunidade a todos que o procuram. Pelo acesso que me facilitou a uma pesquisa mais alargada e enriquecedora, o meu mais sincero agradecimento e a certeza de que todas as oportunidades a mim concedidas nunca serão esquecidas.*

*Ao meu co-orientador **Prof. Renato Augusto DaMatta**, que durante a execução do trabalho foi bem mais que um orientador, foi um verdadeiro amigo. Sou inteiramente grata pela orientação que ultrapassou a tese, e pelo imenso carinho nos momentos de dificuldade e de dor. Pela sua valiosa colaboração, pela confiança, paciência, dedicação, momentos de brincadeiras e “puxões-de-orelha”. Ah, e pelos incontáveis lenços!!*

*Aos meus pais **Luigi Macchi** e **Estelina de Matos Macchi**, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de esperança; sempre repetindo palavras essenciais (como amor, fé, compreensão e alegria) infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos. Obrigada por entenderem a minha ausência. Vocês são a lição mais profunda que vivi de ética, dignidade e amor...*

*As minhas irmãs **Beatriz Barreto**, **Gigliola Macchi** e **Paloma Macchi** que, apesar da distância, com amor infinito me ensinaram a enxergar através de pequenos detalhes a importância da vida, expressando-a em cada gesto, cada abraço, cada troca de olhar ou cada cafuné, tornando a vida ainda mais bela. Em especial, a **“Gigi”**, que foi uma verdadeira amiga quando eu mais precisei e quando eu menos esperava. Amo vocês!*

Ao **Fábio Monte**, que foi presente em minha vida como meu namorado, amante e melhor amigo. Que com carinho e paciência vivenciou comigo muitas descobertas que só o amor pode proporcionar. Com seu jeito especial esteve ao meu lado em momentos importantes, me ajudando sempre a vencer, **juntos**, a realidade do meu dia a dia. Por isso, a você, não poderia faltar o meu mais profundo e sincero agradecimento.

Ao seu **João Gualberto** e dona **Maria Monte**, pessoas muito especiais, digo “anjos”, que entraram em minha vida. Não tenho palavras e nem gestos para retribuir a ajuda, a força e o carinho que me dedicaram, mesmo quando eu estava longe.

A **Andrea Cesar** que me “adotou” em seus almoços em família, quando eu estava longe da minha, na longa temporada em Campos dos Goytacazes-RJ. Mas principalmente por ser compreensiva e carinhosa, ou melhor, ser **amiga**. Também ao **Eduardo da Matta** e **Gabriela da Matta** pelos divertidos momentos de conversa nos almoços “em família”.

A **Deuzelina Vasconcelos**, in memoriam, pelo amor e dedicação de mãe, a mim dispensados em todos os momentos que precisei. Você é eterna em nossos corações.

Ao **Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos**, pela amizade dedicada ao longo de anos, sempre com doces palavras quando eu tentava, em vão, fugir de tudo...

Ao **Prof. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho**, pela disposição e colaboração valiosa na análise dos cortes histopatológicos.

Ao **Prof. Antônio Peixoto Albernaz**, por ter aberto as portas de seu laboratório para a realização dos ensaios hematológicos e bioquímicos.

Ao **Prof. Claudio Andrés Retamal** pela valiosa ajuda nos experimentos com eletroforese, além de sua amizade e disposição em ajudar.

Ao **Prof. Dr. Paulo Pimenta**, do Centro de Estudos René Rachou (FIOCRUZ-MG), pela contribuição ao trabalho com o fornecimento da cepa de *Plasmodium gallinaceum*, objeto do trabalho.

Aos meus grandes e eternos amigos **Gemilson Pontes**, **Lauze Lee Ferreira** e **Luciana Leal**, pelos momentos de alegrias ou mesmo de tensões que sempre dividimos, mesmo com a distância que a vida nos impõe. Obrigada pela amizade de vocês.

Aos amigos do LNMC/ICB/UFPA: **Karla Marques** (“Lindona”), pela sua dedicação; por diversas vezes me auxiliar nos “pintocídios” (desculpa ter falhado inúmeras vezes); **Profa. Gilmara Bastos**, **Luís Maués**, **Prof. Moisés Hamoy**, **Marcos Lebrege**, **Reinaldo Magalhães**, **Igor Victor Santos**, **Claudia Bobadilla**, **Tarsis Sousa** e, em especial, **Neidiane Ramos**, pelos momentos

de aprendizado, de estresse e, sobretudo, pelas conversas úteis e fúteis, que renderam boas gargalhadas.

Ao **Prof. Chubert Sena**, que durante a redação do documento me proporcionou sua companhia sempre encorajadora. Obrigada pelas contribuições e, sobretudo, pela amizade.

A **Adelfa Russelakis**, pela amizade incondicional a mim dedicada e, acima de tudo, pela confiança em mim depositada. Obrigada pela força em momentos não agradáveis.

Ao **Farlen J.B. Miranda**, que mesmo com seu jeito “travado” e esquivo, me mostrou a pessoa sincera e amiga que é de verdade. Obrigada pelos ensinamentos, pela imensurável ajuda com a manutenção da cepa de *Plasmodium gallinaceum*, com os experimentos de hematologia, captura de imagens das células sanguíneas, cultura e montagem em lâmina de trombócitos e, especialmente, pela amizade verdadeira. Por diversas vezes me escutar e me deixar chorar, sem críticas; pelas inúmeras conversas, em que quase só eu falava... suas palavras, mesmo que poucas, foram essenciais no momento. Sou infinitamente grata.

A **Fernanda Souza**... nem sei o que escrever, pois palavras não iriam conseguir expressar o quão grata eu sou. Mas, vou tentar. Pela contagem das lâminas de trombócitos obtidos em cultivo, pela incansável disposição em ajudar nos trabalhos árduos e a sede em querer aprender sempre mais. Pelas “caras e bocas” que por vezes substituíram minhas lágrimas por sorrisos. Pelas inúmeras conversas no “nosso cantinho”, o aviário do CBB/UENF.

Aos amigos do Setor de Parasitologia do LBCT/CBB/UENF: ao **João Cláudio Damasceno**, que com seu humor ímpar, tornou meus dias mais alegres, quando estavam tão escuros, me fazendo rir até mesmo do que me deixava triste, além dos divertidos momentos no “escurinho do cinema”; a **Juliana Azevedo**, que com sua disposição e alegria contagiantes, me deu ânimo em situações onde o desespero queria me tomar; a **Luciana Lemos**, que com seu jeito doce e inocente, um pouco atrapalhado eu diria, se mostrou uma amiga para todas as horas; ao **Gabriel Rabelo**, pela sua dedicação e disposição em ajudar sempre... enfim, ao **João Roberto Neto**, **Laura Mota**, **Tiago**, **Luiz Renato Maciel**... Guardo vocês num lugar bem especial.

Aos amigos de Campos dos Goytacazes-RJ: **Letícia Rocha**, **Brunna Xavier**, **Gildeíde Costa**, **Julianna Santos**, **Daniele Santos**, **Jaine Polonini**, **Camila Ventura**, **Aline Ventura**, **Marlon Heggdorne**, **José Paulo Mota**, pelos momentos de conversas, de brincadeiras, enfim, de desabafos, que tornaram meus dias mais leves e ajudaram a esquecer, por momentos, a distância de casa; a **Pamela Busch**, pela imensurável acolhida nos momentos de enorme nostalgia, com palavras ou simplesmente com o silêncio. A **Camille Pessanha** e **Joana Borges**, pela amizade

*durante a convivência ao longo de meses; saibam que aprendi muito com vocês. A **Germana Bueno e Umberto Zottich**, pela acolhida e amizade a mim dispensada. Em especial, a **Susane Borges, Marcela Possoly e Priscila Pixoline**, por terem me proporcionado uma agradável convivência e muitas vivências, tornando mais divertidos meus últimos dias em Campos. Ah claro, e a “**Nina**”, que por inúmeras vezes foi minha única companhia, SEMPRE me ouvindo.*

*Aos técnicos do LBCT/CBB/UENF: **Beatriz Ferreira, Giovana Moraes, Arthur Rodrigues, Luciana Timóteo, Márcia Adriana Dutra, Adriana Martins, Rosemary Maciel, Darli Grativol, Fábio Oliveira**, sempre dispostos a ajudar e por tornarem mais alegres os meus dias de trabalho. Obrigada pelas risadas nos corredores do LBCT.*

*Aos professores do LBCT/CBB/UENF: **Arnoldo Rocha Façanha, Arthur Giraldi Guimarães, Claudete Santa-Catarina, Clóvis de Paula Santos, Maura da Cunha, Maria Luisa López, Nadir Francisca Sant’anna**, pela disposição e colaboração sempre que precisei.*

*Aos amigos da Divisão Administrativa do ICB-UFGA: **Heyder Almeida, Angela Cardoso, Vanessa Meneses, Fabiano Oliveira**, pela amizade e empenho em ajudar sempre, quando busquei auxílio.*

*Aos amigos da EAD-UFGA: **Adriana Raiol, Sheila Vilhena, Jackson Pinheiro, Verônica Bahia**, pelos bons momentos proporcionados quando estive presente na família EAD. Obrigada pela amizade de vocês!*

*Ao pessoal do Setor de Patologia Clínica do LSA/CCTA/UENF, **Anderson Barros e Josias Machado**, pelos bons momentos compartilhados nas horas de trabalho, pelos ensinamentos e, em especial, Josias, pelo ombro amigo no momento em que me senti sem chão.*

*Aos técnicos do Setor de Anatomia Patológica do LSA/CCTA/UENF, **Luciano Grillo e Elizabete**, pela ajuda no processamento dos órgãos e confecção das lâminas de histopatologia.*

*Aos seguranças da UENF, **Ivan (HoVet), Edilza (CBB), Fabrício e Jonas (P4)**, que com humor e disposição, estiveram sempre prontos a ajudar. A ajuda de vocês foi muito importante.*

As instituições de ensino, Universidade Federal do Pará (UFGA), que me acolheu como aluna e proporcionou a oportunidade de continuar os meus estudos, e Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) por abrir as portas para a execução desse trabalho.

As instituições de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Malária é uma das doenças infecciosas de maior causa de morte no mundo. Modelos experimentais são necessários para melhor compreensão de mecanismos envolvidos na patogênese de doenças e desenvolvimento de novos tratamentos. Galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* fornecem bom modelo de malária devido a proximidade filogenética com o *Plasmodium* de humano assim como aspectos clínicos comuns, como a malária cerebral. O presente estudo objetivou investigar a participação do óxido nítrico no desenvolvimento da malária aviária, através do tratamento ou não com aminoguanidina (AG - inibidor da enzima Óxido Nítrico Sintase) *in vivo* de galinhas infectadas experimentalmente com *P. gallinaceum*. Foi verificado sobrevida, hematologia clássica, bioquímica sérica e patologia nos animais no percurso da infecção. Observou-se maior sobrevida nos animais tratados com AG, apesar de parasitemias mais elevadas. Houve ainda diminuição nos parâmetros hematológicos e aumento no Volume Corpuscular Médio de hemácias, indicando resposta medular para anemia. Linfopenia e trombocitopenia foram detectadas em animais infectados, com menor proporção nos animais tratados. Monócitos, linfócitos e heterófilos apresentaram aumento de tamanho e alterações que indicam ativação. Trombócitos também aumentaram de tamanho durante a infecção e apresentaram morfologia atípica. Os animais tratados mostraram lesões mais brandas nas secções histopatológicas de cérebro, fígado e baço, além de produção diminuída de NO, mesmo em alta parasitemia, em relação aos animais não tratados. Esses resultados confirmam a participação do mediador químico óxido nítrico na patogênese da malária no modelo experimental aviário.

Palavras-chave: malária, óxido nítrico, galinha, *Plasmodium gallinaceum*, aminoguanidina, trombócito.

ABSTRACT

Malaria causes major losses to human populations in the world. Experimental models are needed for a better understanding of the pathological mechanisms of the diseases and the development of new treatments. Chickens infected with *Plasmodium gallinaceum* constitute an adequate malaria model due to the phylogenetic proximity of this parasite to human *Plasmodium* as well as similarities in disease manifestation, as cerebral malaria. The aim of the present study was to investigate the role of nitric oxide in avian malaria development in chickens experimentally infected with *P. gallinaceum*, treated or not with aminoguanidine (AG - nitric oxide synthase inhibitor). Survival, classical hematology, serum biochemistry and pathology was assayed during the development of the disease. The greatest survival was observed in animals treated with AG that also presented higher parasitemia. Decrease in hematological parameters and Mean Corpuscular Volume of erythrocytes increase was showed, indicating bone marrow response to anemia. Lymphopenia and thrombocytopenia were detected in infected animals, but not at the same proportion in treated animals. Monocytes, lymphocytes and heterophils showed an increase in size and changes that indicated activation. Thrombocytes were also higher with the infection and with atypical morphology. Treated animals showed fewer lesions in histological sections of brain, liver and spleen, and NO production decreased, principally during high parasitemia, compared to untreated animals. These results characterize the participation of the chemistry mediator nitric oxide in the pathogenesis of malaria in the avian model.

Keywords: malaria, nitric oxide, chickens, *Plasmodium gallinaceum*, aminoguanidine, thrombocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida do gênero <i>Plasmodium</i> envolvendo o hospedeiro definitivo (invertebrado) e o hospedeiro intermediário (vertebrado)	05
Figura 2. Filograma baseado na análise da proteína circumesporozoíta (CS)	07
Figura 3. Hipóteses alternativas para as relações filogenéticas entre as espécies de <i>Plasmodium</i>	09
Figura 4. Hipótese para o mecanismo da patogênese da malária cerebral	12
Figura 5. Hipótese para a interação de plaquetas com eritrócitos infectados durante a infecção malárica	18
Figura 6. Representação esquemática do envolvimento de plaquetas e endotélio cerebral na patogênese da malária cerebral	19
Figura 7. Desenho dos grupos experimentais e divisão dos subgrupos para coleta de sangue	32
Figura 8. Esquema cronológico do experimento: inoculação com parasito, tratamento com AG e coleta de sangue	34
Figura 9. Sobrevida e parasitemia de aves infectadas com <i>P. gallinaceum</i>	42
Figura 10. Parâmetros hematológicos da série vermelha de galinhas infectadas com <i>P. gallinaceum</i> tratadas ou não com aminoguanidina	44
Figura 11. Eritrócitos de aves infectadas com <i>P. gallinaceum</i>	45
Figura 12. Monócitos, heterófilos e trombócitos infectados com <i>P. gallinaceum</i>	46
Figura 13. Número absoluto de leucócitos totais e trombócitos de galinhas infectadas com <i>Plasmodium gallinaceum</i> tratadas ou não com AG	47
Figura 14. Número absoluto de linfócitos, monócitos e heterófilos de galinhas infectadas com <i>P. gallinaceum</i> tratadas ou não com AG	50
Figura 15. Monócitos, linfócitos e plasmócito de galinhas infectadas ou não com <i>P. gallinaceum</i>	51
Figura 16. Eosinófilos e heterófilos de galinhas infectadas ou não com <i>P. gallinaceum</i>	52
Figura 17. Trombócitos de galinhas infectadas com <i>P. gallinaceum</i> em extensões sanguíneas corados com Giemsa e após cultura por 1h	54

Figura 18. Trombócitos atípicos positivos para anticorpo anti-trombócito 11C3 e raramente encontrados em extensões sanguíneas coradas	56
Figura 19. Contagem diferencial de tipos de trombócitos, obtidos em cultura, de galinhas não infectadas, tratadas ou não com AG	58
Figura 20. Contagem diferencial de tipos de trombócitos, obtidos em cultura, de galinhas infectadas com baixa parasitemia, tratadas ou não com AG	59
Figura 21. Contagem diferencial de tipos de trombócitos, obtidos em cultura, de galinhas infectadas com alta parasitemia, tratadas ou não com AG	60
Figura 22. Bioquímica sérica de galinhas infectadas com <i>P. gallinaceum</i> tratadas ou não com AG	62
Figura 23. Níveis de nitrito no plasma de galinhas infectadas com <i>P. gallinaceum</i> tratadas ou não com AG	63
Figura 24. Secções histopatológicas de baço de galinhas infectadas com <i>P. gallinaceum</i> , tratadas ou não com AG	65
Figura 25. Secções histopatológicas de fígado de galinhas infectadas com <i>P. gallinaceum</i> , tratadas ou não com AG	67
Figura 26. Secções histopatológicas de cérebro de galinhas infectadas com <i>P. gallinaceum</i> , tratadas ou não com AG	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação morfológica das anemias.....	23
Tabela 2. Bioquímica sérica: testes e suas indicações de funcionalidade.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

AG - aminoguanidina.

ALT - alanina aminotransferase.

ANOVA - análise de variância.

AST - aspartato aminotransferase.

BSA - albumina bovina sérica.

Ca²⁺ - íon cálcio.

CD36 - molécula expressa na superfície de células.

CEs - células endoteliais.

CHCM - concentração da hemoglobina corpuscular média.

CK - creatina-quinase.

CS - proteína circumesporozoíto.

CXCL4, CXCL7 - quimiocinas.

DARC - receptor do antígeno Duffy para quimiocinas.

dpi - dias pós-infecção

DMEM - meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagles Medium*.

EC - endotélio cerebral.

EDRF - endothelial derived relaxing factor.

EDTA - ethylenediamine tetraacetic acid.

EIs - eritrócitos infectados.

ELAM - molécula de adesão leucócito-endotélio.

ELISA - enzyme linked immunosorbent assay.

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial.

EROs - espécies reativas de oxigênio.

FAL - fosfatase alcalina.

ICAM - molécula de adesão intercelular.

ICs - complexos imunológicos.

IL - interleucina.

IL-1 - interleucina-1.

IFN- γ - interferon gama.

iNOS - óxido nítrico sintase induzida.

LDH - lactato desidrogenase.

L-NAME - L-nitro-arginina metil Ester.

L-NARG - L-nitro-arginina.

LPS - lipopolissacarídeo.

LT - linfotoxina.

MPE - micropartículas derivadas de eritrócitos.

MPP - micropartículas derivadas de plaquetas.

NADPH - nicotinamida dinucleotídeo reduzida.

NK - células natural killer.

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal.

NO - óxido nítrico.

PAF - fator ativador de plaquetas.

PBS - tampão fosfato.

PFA - paraformaldeído.

PfEMP1/2 - proteína de superfície de merozoíto de *Plasmodium* 1/2.

pi - pós-infecção.

PMN - neutrófilos polimorfonucleares.

rpm - rotações por minuto.

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa.

TRITC - tetramethylrhodamine isothiocyanate chloride.

VCAM - molécula de adesão vascular.

VCM – volume corpuscular médio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 MALÁRIA: CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2 MALÁRIA AVIÁRIA: CONSIDERAÇÕES GERAIS	6
1.3 MALÁRIA CEREBRAL	11
1.4 ÓXIDO NÍTRICO E MALÁRIA	13
1.5 HEMATOLOGIA CLÁSSICA DE AVES	19
1.6 BIOQUÍMICA SÉRICA	26
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Comitê de Ética	31
3.2 Animais	31
3.3 Cepa de <i>Plasmodium gallinaceum</i>	31
3.4 Grupos experimentais	32
3.5 Tratamento com aminoguanidina (AG) e infecção com <i>Plasmodium gallinaceum</i>	32
3.6 Determinação da parasitemia e temperatura	33
3.7 Coleta de sangue	34
3.8 Hematologia clássica	34
3.9 Funções hepática e renal	36
3.10 Produção de Óxido Nítrico no plasma	37
3.11 Obtenção de trombócitos em cultura	38
3.12 Fixação e coloração dos trombócitos	39
3.13 Análise morfológica de trombócitos por imunofluorescência	39
3.14 Histopatologia de órgãos	39
3.15 Histopatologia de órgãos	40
3.16 Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Malária é uma das mais importantes doenças infecciosas do mundo. Silenciosamente atinge meio bilhão de pessoas no planeta todos os anos, e leva ao óbito centenas de milhares delas, principalmente crianças (OMS, 2009). Além de sua ampla distribuição pelo mundo, é relativamente comum em muitas espécies de animais (Schall, 1990; Slater, 2005; Snow *et al.*, 2005; OMS, 2009). Caracterizada pela tríade febre, calafrio e cefaléia, a malária é causada pelo hemoparasito do gênero *Plasmodium* (protozoários do filo Apicomplexa) e transmitida por vetores anofelinos fêmeas, principalmente *Anopheles darlingi* (Krettli, 1994). 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 (Krettli, 1994; Valkiunas, 2005; Slater, 2005).

Em humanos, foram reconhecidas apenas quatro espécies causadoras da malária: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale* (Bruce-Chwatt, 1980). Destas, apenas o *P. ovale* não é encontrado no Brasil. O *P. vivax* é o responsável pelo maior número de casos clínicos, no entanto, o maior número de mortes é atribuído ao *P. falciparum*, que causa a malária grave com acometimento de múltiplos órgãos, dentre eles o cérebro (OMS, 2009). Recentemente, foi descrito infecção em humanos por *P. knowlesi*, antes descrito apenas como parasito de primatas não-humano (Ta Tang *et al.*, 2010). Em outros vertebrados, podemos destacar as espécies *P. berghei* e *P. chabaudi*, responsáveis

pela infecção em camundongos (Slater, 2005), e *P. juxtannucleare* e *P. gallinaceum*, responsáveis pela infecção em galinhas (Garnhan, 1966; Slater, 2005).

1.1.1 Ciclo biológico do gênero *Plasmodium*

O ciclo é do tipo heteroexênico, com necessidade de dois hospedeiros – um definitivo para a fase sexuada ou esporogônica (artrópode) e um intermediário para a fase assexuada ou esquizogônica (vertebrado). Os plasmódios possuem complexo ciclo de vida, com várias formas dentro de cada hospedeiro que pode se diferenciar dependendo da espécie envolvida. De modo geral, o ciclo inicia logo após a picada do mosquito, que no repasto sanguíneo injeta os esporozoítos (forma infectante para o hospedeiro vertebrado) acumulados nas glândulas salivares. Estas formas, pequenas e móveis, permanecem na corrente sanguínea por 15-45 minutos, após os quais, desaparecem do sangue e são encaminhadas até o fígado onde invadem os hepatócitos. Nos hepatócitos, o parasito reproduz assexuadamente, formando os esquizontes hepáticos. Após 4 a 12 dias, dependendo da espécie, as células parasitadas se rompem, liberando os merozoítos nos capilares intra-hepáticos (Moore *et al.*, 2002; Jaramillo *et al.*, 2004; Slater, 2005).

Nas infecções por *P. falciparum* e *P. malariae*, os esquizontes teciduais são liberados ao mesmo tempo, enquanto que nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, formas denominadas hipnozoítos, persistem no interior dos hepatócitos, ficando latentes no fígado por vários meses. As recaídas observadas em infecções por estas duas espécies são atribuídas a estas formas latentes (Moore *et al.*, 2002).

Cada merozoíto é capaz de invadir uma hemácia e reproduzir assexuadamente, originando milhares, que se transformam em trofozoítos jovens, os quais crescem e dividem-se originando os esquizontes hemáticos, que são liberados após rompimento das hemácias, sob a forma de merozoítos, os quais invadem novas hemácias e o ciclo,

denominado esquizogonia eritrocítica, é renovado (Moore *et al.*, 2002). A ruptura das hemácias é a causa da febre malárica, sendo nesta etapa do ciclo que os parasitos metabolizam a hemoglobina da hemácia, originando à hemozoína ou pigmento malárico, o qual é depositado em diversos órgãos durante o quadro clínico da doença. Após vários ciclos de reprodução, múltiplos novos merozoítos crescem e transformam-se em gametócitos (formas sexuadas), que se diferenciam em masculinos e femininos, micro e macrogametócitos, respectivamente. Esses gametócitos circulantes são as formas infectantes para o mosquito (Moore *et al.*, 2002).

O ciclo no mosquito é iniciado com o repasto sanguíneo em indivíduo portador das formas sexuadas do parasito. No estômago do mosquito o macrogametócito dá origem ao macrogameta e o microgametócito sofre mitoses, resultando em oito núcleos que formam microgametas, por processo denominado exflagelação. Após união dos gametas, há a formação de uma célula ovo ou zigoto. Algumas horas depois, o zigoto, agora chamado oocineto, migra para o epitélio intestinal do mosquito alojando-se no próprio epitélio ou entre este e a membrana basal. Adquire então um envoltório protetor, transformando-se em oocisto, dando início a uma multiplicação esporogônica gerando milhares de esporozoítos, que após ruptura do oocisto maduro, são liberados na hemolinfa do inseto de onde migram para a glândula salivar e serão passados a um novo hospedeiro, reiniciando o ciclo (Moore *et al.*, 2002; Póvoa *et al.*, 2000) (Figura 1).

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 conseqüências de processos resultantes da invasão e ruptura da hemácia ou da obstrução de vasos capilares profundos. A patogenia da malária

passou a ser considerada como resultado da produção de citocinas pro-inflamatórias (–TNF- α , interleucinas (como IL-1, IL-6), linfotoxinas e 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).

1.1.3 Modelos experimentais

Como uma das principais causas de morte pela infecção do *Plasmodium sp.* está relacionada a malária cerebral, inúmeros trabalhos e modelos experimentais foram desenvolvidos. 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).

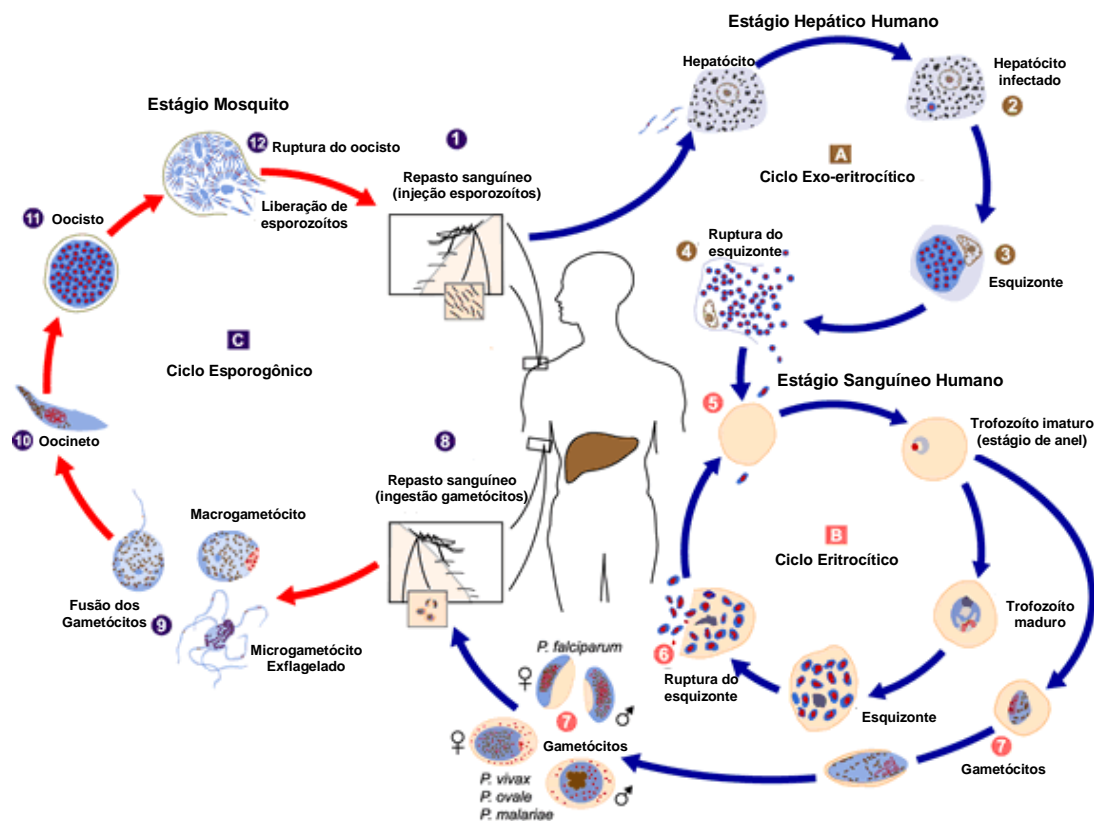


Figura 1. Ciclo de vida do gênero *Plasmodium* envolvendo o hospedeiro definitivo (invertebrado/mosquito) e o hospedeiro intermediário (vertebrado/homem). (A-B) Ciclo esquizogônico no hospedeiro vertebrado; A, ciclo exo-eritrocítico e B, ciclo eritrocítico. (C) Ciclo esporogônico no hospedeiro invertebrado. (1) Injeção de esporozoítos pelo mosquito no repasto sanguíneo, com posterior infecção de hepatócitos (2) e formação de esquizonte hepático (3). A ruptura do esquizonte hepático libera merozoítos (4) e inicia o ciclo eritrocítico (5) com formação do esquizonte hemático (6), que ao romper as formas liberadas, merozoítos hemáticos, podem iniciar um novo ciclo eritrocítico ou evoluir para gametócitos, macho e fêmea (7), formas infectantes para o mosquito. Após o repasto sanguíneo (8), há a fusão dos gametócitos (9) e início do ciclo esporogônico, com o surgimento da forma oocineto (10) e oocisto (11), que se rompe (12) liberando os esporozoítos, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado. Fonte: adaptado de www.uni-tuebingen.de/modeling/images/malaria_LifeCycle.gif.

1.2 MALÁRIA AVIÁRIA: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Há diversos estudos sobre a prevalência e os aspectos morfológicos dos parasitos da malária aviária, assim como aspectos da interação ecológica e evolutiva entre os parasitos e seus hospedeiros (Garnham, 1966; Swann, 1974; Perkins e Schall, 2002; Slater, 2005).

A malária em galinhas domésticas pode ser causada por duas espécies de plasmódios: *Plasmodium juxtannucleare* e *Plasmodium gallinaceum*, onde no Brasil apenas o *P. juxtannucleare* é encontrado em infecção natural (Krettli, 1972; Mota *et al.*, 2000).

Em 1935, o *Plasmodium gallinaceum* foi descrito por Brumpt ao observar esfregaços sanguíneos de galinhas domésticas. A partir de então foi um dos plasmódios mais estudados em todo o mundo como modelo para atividade de drogas com potencial antimalárico (Paraense, 1946; Garnhan, 1966). As espécies de plasmódios possuem comportamento diverso, onde uma espécie pode parasitar hospedeiros diferentes (silvestres e domésticos) e ser transmitida por mosquitos em laboratórios ou ainda, passagens sanguíneas com sangue infectado, como ocorre com o *P. gallinaceum* (Garnham, 1966).

O modelo de malária aviária em galinhas domésticas é interessante pelo fato do *P. gallinaceum* estar, em alguns aspectos, próximo ao *P. falciparum*, e desencadear quadro de malária clínica também semelhante, com sinais e sintomas de malária cerebral decorrente da forma exo-eritrocítica 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 seqüência 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 2).

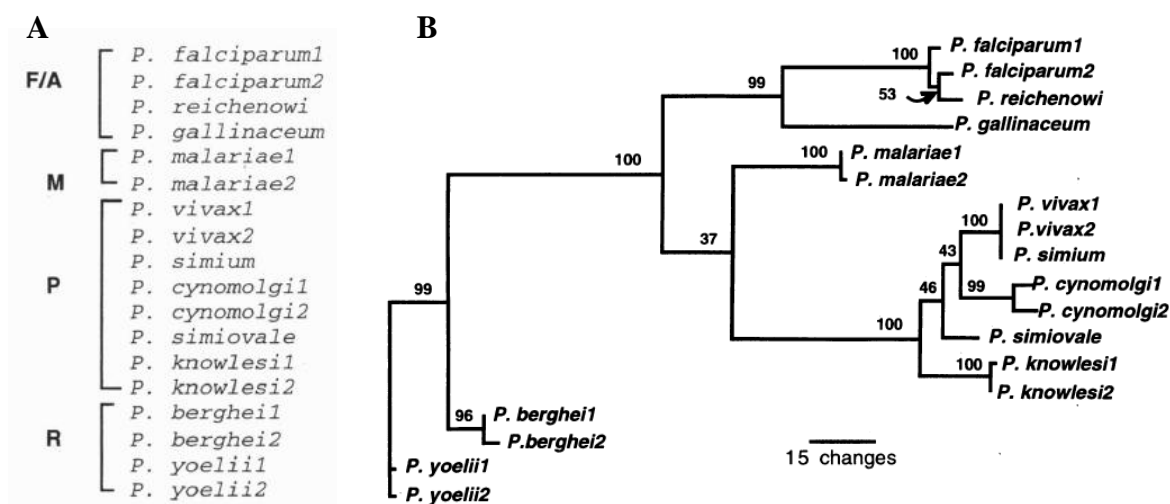


Figura 2. Filograma baseado na análise da proteína circumesporozóita (CS). A, divisão em quatro grupos baseados na análise da seqüência sinal de aminoácidos: plasmódio aviário com *P. falciparum* - A/F; *P. malariae* - M; plasmódios de primatas - P; plasmódios de roedores - R. B, árvore filogenética 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.

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 e Barta, 1992; Escalante and Ayala, 1994; McCutchan *et al.*, 1996; Qari *et al.*, 1996; Perkins e Schall, 2002; Roy e Irimia, 2008; Silva *et al.*, 2010). Alguns estudos evolutivos demonstram proximidade entre as espécies ao analisar diferentes sequências gênicas (McCutchan *et al.*, 1996; Escalante e Ayala, 1994). Por outro lado, algumas recentes análises de raras modificações nos genomas mitocondriais suportam a idéia de monofiletismo das espécies de plasmódios de mamíferos (Roy e Irimia, 2008).

Silva *et al.* (2010), ao analisar 45 sequências gênicas ortólogas de genoma mitocondrial de oito espécies de plasmódio, mostra uma árvore em que o *P. gallinaceum* aparece em posição com aspectos genéticos similares que o coloca próximo filogeneticamente aos parasitos de primatas *P. falciparum* e *P. Reichenowi* (Figura 3). No entanto, a resolução dessas questões filogenéticas é prejudicada pelo pequeno número de locos amostrados. As grandes distâncias evolutivas envolvidas e viés na composição de nucleotídeos de alguns genomas nucleares de *Plasmodium*, aumentam ainda mais essa dificuldade (Silva *et al.*, 2010).

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 consequência 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).

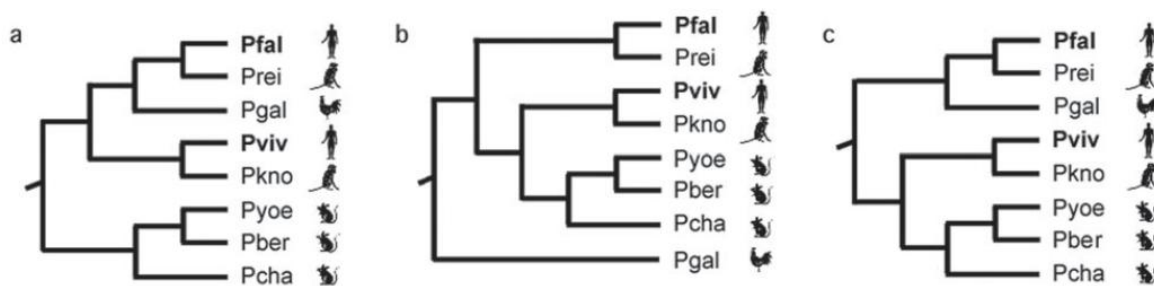


Figura 3. Hipóteses alternativas para as relações filogenéticas entre as espécies de *Plasmodium*. Pfal=*P. falciparum*; Prei=*P. reichenowi*; Pgal=*P. gallinaceum*; Pviv=*P. vivax*; Pkno=*P. knowlesi*; Pyoe=*P. yoelii*; Pber=*P. berghei*; Pcha=*P. chabaudi*. Fonte: Silva *et al.*, 2010.

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 (Frevet *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 e 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 and Juhl, 2002; Slater, 2005; Williams, 2005; Frevet *et al.*, 2008; Silveira *et al.*, 2009; Macchi *et al.*, 2010). 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 *P. falciparum* possuem a capacidade de aderir às células do endotélio da microcirculação, pois além da exposição dos antígenos do parasito na membrana da hemácia (“*knobs*”), há ainda a exposição de moléculas de adesão ao endotélio (Berendt *et al.*, 1994; Hearn *et al.*, 2000; Dietrich, 2002; Haldar *et al.*, 2005). Os antígenos do parasito modificam o metabolismo normal do eritrócito infectado, favorecem a sobrevivência do parasito e são importantes para a patologia da malária grave, devido a ativação de moléculas de adesão que permitem sua adesão ao endotélio (citoaderência) (Daniel-Ribeiro & Ferreira-da-Cruz, 2000; Clark & Cowden, 2003; Haldar *et al.*, 2005). A citoaderência compromete o fluxo sanguíneo por obstrução de pequenos vasos, o que causa hipoxia do tecido e acidose láctica, e gera distúrbios metabólicos no hospedeiro (Dietrich, 2002). Também designa a adesão de hemácias parasitadas a hemácias não parasitadas (*rosetas*), que parece ser o fator potencializador da patologia (Kirchgatter & Portillo, 2005).

Somente esse fenômeno não explica as características da malária cerebral (Clark *et al.*, 1991; Clark & Cowden, 2003). Portanto, outra hipótese sugere que a resposta exacerbada do sistema imune, com envolvimento de células T, monócitos, moléculas de adesão, citocinas e mediadores químicos, como o NO, induz destruição tecidual (Medana *et al.*, 2001; Derouich-Guergour, 2001) (Figura 4).

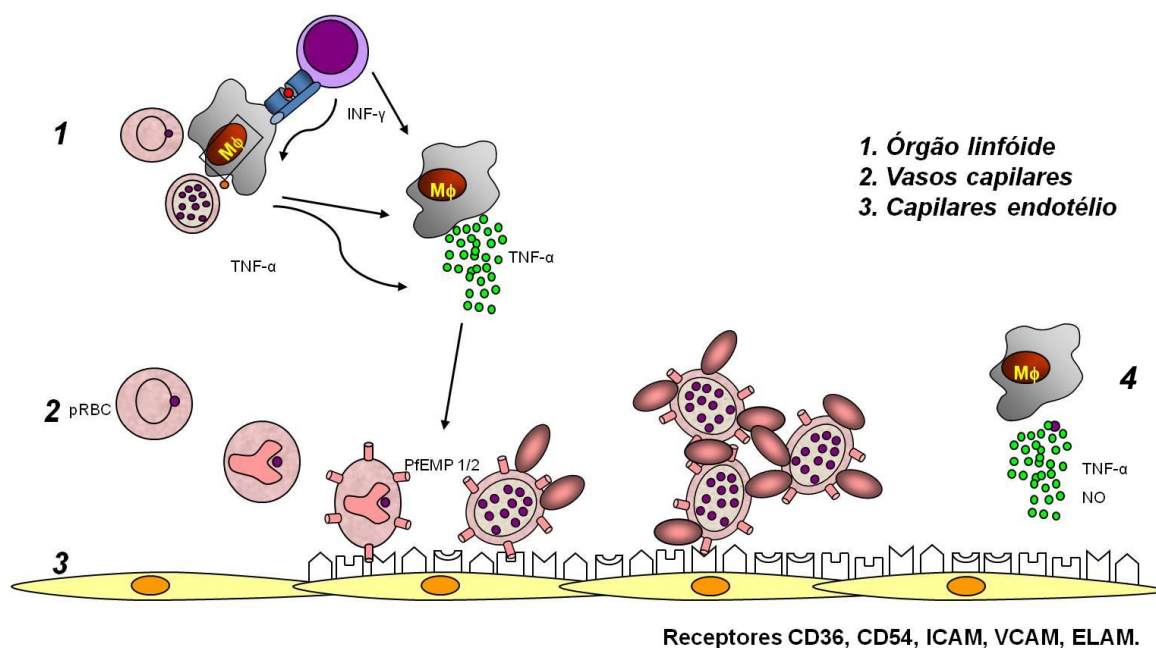


Figura 4. Hipótese para o mecanismo da patogênese da malária cerebral. (1) Monócitos-macrófagos estimulados por antígenos do parasito (expressos na superfície da hemácia) e por citocinas (liberadas por linfócitos em resposta a infecção) produzem grandes quantidades de TNF- α , induzindo a expressão aumentada 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 E MALÁRIA

Um dos mediadores químicos bastante estudados na malária 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).

Em um experimento, Furchgott e Zawadzki (1980), inferiram sobre a existência de um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF – *Endothelial Derived Relaxing Factor*) e no final dos anos 80, Ignarro *et al* (1987; 1988) sugeriram que o EDRF era o NO, gás de potente ação vasodilatadora, comprovado em experimento no qual a vasodilatação do endotélio foi estimulada pela produção de NO a partir da L-arginina (Palmer *et al.*, 1987).

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). Existem três isoformas de NOS: duas constitutivas, neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), que produzem NO sem a necessidade de novas sínteses protéicas, com atividade regulada pelo complexo cálcio-calmodulina (Moncada *et al.*, 1991), e a isoforma induzida (iNOS), independente do íon Ca^{2+} e está relacionada a resposta imunológica. A iNOS é expressa em macrófagos e ativada após estimulação por citocinas (IL-1, INF- γ e TNF- α) e lipopolissacarídeos (LPS) (Förstermann *et al.*, 1994).

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 (Corbett & McDaniel, 1996; Boer *et al.*, 2000).

Na malária, há trabalhos que associam as alterações neurais a elevados níveis de citocinas o que eleva a produção de NO através da iNOS (Ghigo *et al.*, 1995). Apesar de várias hipóteses correlacionarem o NO com esta manifestação clínica da malária, seu papel ainda permanece obscuro. Estudos demonstraram que a malária cerebral murina não envolve produção de NO, já que camundongos deficientes em iNOS desenvolvem malária cerebral (Rudin *et al.*, 1997). Essa hipótese foi suportada por Favre *et al.* (1999), com resultados semelhantes. No entanto, 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, e Macchi *et al.* (2010) demonstraram aumento na produção de nitrito por macrófagos de animais infectados com *P. gallinaceum*, evidenciando a participação do NO na patologia da doença.

1.4.1 NO 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 AG, inibidor seletivo da isoforma iNOS. Portanto, já se conhece as concentrações de moléculas que bloqueiam a produção de NO em galinhas.

Neste sentido estudou-se neste trabalho aspectos fisiológicos da malária aviária com o bloqueio da produção de NO. Esse estudo proporcionará o melhor entendimento do modelo de malária aviária, incluindo a cerebral, e aspectos hematológicos, bioquímicos, e patológicos de galinhas infectadas com *P. gallinaceum*.

1.4.2 Trombócitos e malária

Estudos recentes evidenciam associação entre trombocitopenia e malária, o que sugere importante papel para as plaquetas na patogênese da malária cerebral. Existe uma ativação de plaquetas devido a interação entre a PfEMP1 (proteína de superfície de merozoíto do *Plasmodium*) e CD36 (molécula expressa na superfície de células) em plaquetas (Cox e McConkey, 2010). Além disso, há evidências de que plaquetas modulam a citoaderência de hemácias parasitadas no endotélio cerebral devido liberação de micropartículas (Faille *et al.*, 2009a; Greenbaun e FitzGerald, 2009; Bridges *et al.*, 2010). Como todas as aves, as galinhas possuem peculiaridades nos elementos figurados do sangue. Não possuem plaquetas, mas células homólogas, os trombócitos. Essas células são bem maiores que as plaquetas e possuem núcleo.

Uma das hipóteses relaciona a interação de plaquetas com eritrócitos infectados (EIs). De acordo com Pleass (2009), as plaquetas são ativadas por moléculas desconhecidas liberadas pelos EIs através de receptor purinérgico (receptor P2Y1). No entanto, permanece indefinido se esta ativação requer contato de EIs com CD36 expresso em plaquetas, assim como a interação dos receptores plaquetários com moléculas liberadas pelo parasito. A ativação das plaquetas resulta na liberação de diferentes grânulos que

contém vários mediadores farmacológicos e imunológicos. Um exemplo é a serotonina, que além de resultar no aumento da permeabilidade vascular e contração do músculo liso, ativa células dendríticas e pode influenciar diretamente no EI, uma vez que agonistas do receptor de serotonina são conhecidos por modular o ciclo de vida do parasita e inibir o crescimento do parasita em cultura (Locher *et al.*, 2003).

Uma análise recente de produtos secretados por plaquetas detectou várias quimiocinas, incluindo CXCL4, CXCL7 que é regulada após a ativação de célula T normal e têm importante papel na chegada gradual de leucócitos, eosinófilos, células natural killer (NK), neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e mastócitos (Garcia *et al.*, 2005). CXCL4 e seu CXCR3 receptor cognato, expresso em células T auxiliares (T CD4), têm demonstrado um papel direto sobre a gravidade da malária cerebral experimental em roedores (Srivastava *et al.*, 2008). CXCL4 estimula a liberação de fator de necrose tumoral (TNF- α) e espécies reativas de oxigênio (EROs) por monócitos, além de induzir apoptose de células endoteliais (CE) que, juntos, podem comprometer a integridade da barreira hematoencefálica.

Pleass (2009) mostra que fatores solúveis, como quimiocinas, liberados por EIs são conhecidos por induzir apoptose em células endoteliais do cérebro humano. CXCL7 recruta PMN, que liberam grandes quantidades de fator ativador de plaquetas (PAF). RANTES é uma potente quimiocina pró-inflamatória e inibidora da replicação do HIV *in vitro* e também conhecida por se ligar ao receptor do antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) e necessária para a invasão dos eritrócitos pelo *P. vivax* (He *et al.*, 2008) (Figura 5).

Na malária cerebral, durante a fase inicial, os níveis elevados de citocinas promovem ampla ativação endotelial que leva ao aumento na ligação das células circulantes, incluindo plaquetas e EIs. Plaquetas aderem aos EIs e em seguida, aderem ao

endotélio cerebral (EC) aumentando a atividade de novas moléculas de adesão entre os tipos celulares e induzindo maior ativação endotelial (Faille *et al.*, 2009a). O endotélio ativado, por sua vez, libera mediadores ativadores de plaquetas. Além disso, as plaquetas são capazes de potencializar alterações na integridade da monocamada endotelial, promovendo degradação da matriz e apoptose, além de prejudicar a reparação vascular (Figura 6).

A presença de plaquetas aderidas a microvasculatura de camundongos (Grau *et al.*, 1993) e pacientes com malária cerebral (Grau *et al.*, 2003), fortaleceu a hipótese de um papel para as plaquetas no sequestro de parasitos, no início da ativação do endotélio e em lesões neurovasculares.

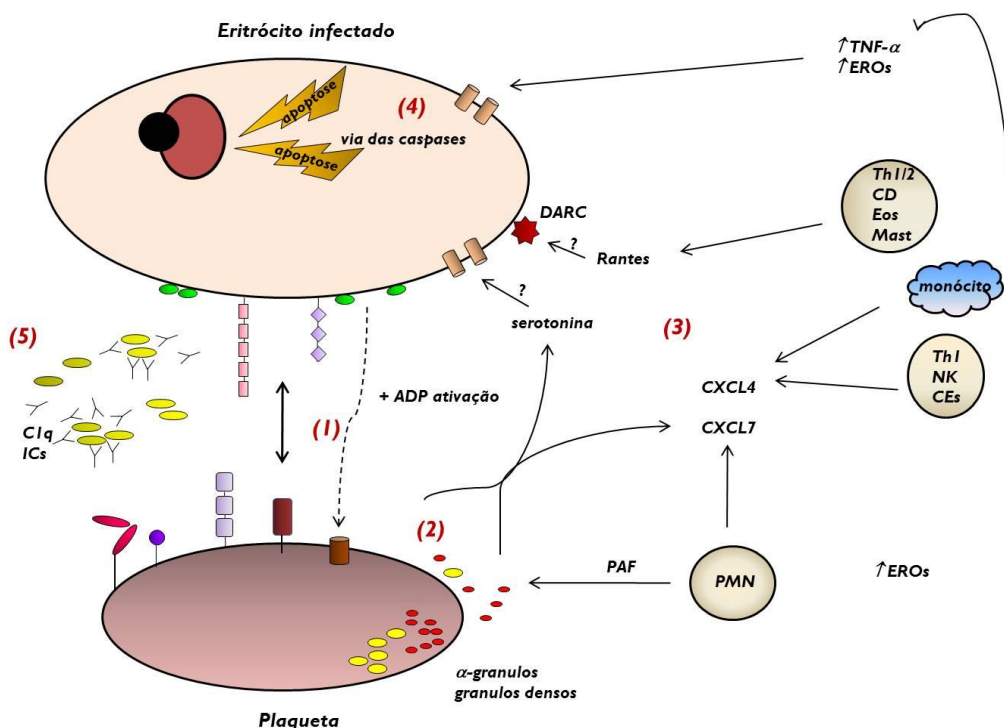


Figura 5. Hipótese para a interação de plaquetas com eritrócitos infectados durante a infecção malárica. (1) Plaquetas são ativadas por moléculas liberadas dos EIs. (2) Ativação de plaquetas libera α -grânulos e grânulos densos com mediadores imunológicos e farmacológicos, como serotonina, que ativa seu receptor, modulando o ciclo de vida do parasito. (3) PMN liberam diferentes quimiocinas (CXCL4, CXCL7), reguladas por células T, CEs, NKs, monócitos. CXCL4 estimulam monócitos a liberar TNF- α e EROs, que induz apoptose em CEs. CXCL7 recruta PMNs a liberar grandes quantidades de PAF. RANTES é uma potente quimiocina pro-inflamatória que se liga ao DARC. (4) TNF- α e EROs, dentre outras moléculas, levam a apoptose do parasito, por mecanismos ainda desconhecidos. (5) Envolvimento de anticorpos e ICs, por mecanismos não conhecidos. Abreviaturas: PMN, polimorfonucleares; CXCL4, CXCL7, quimiocinas; CEs, células endoteliais; NKs, células natural killer; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; EROs, espécies reativas de oxigênio; PAF, fator ativador de plaquetas; DARC, antígeno Duffy receptor para quimiocinas; ICs, complexos imunológicos. Fonte: adaptado de Pleass (2009).

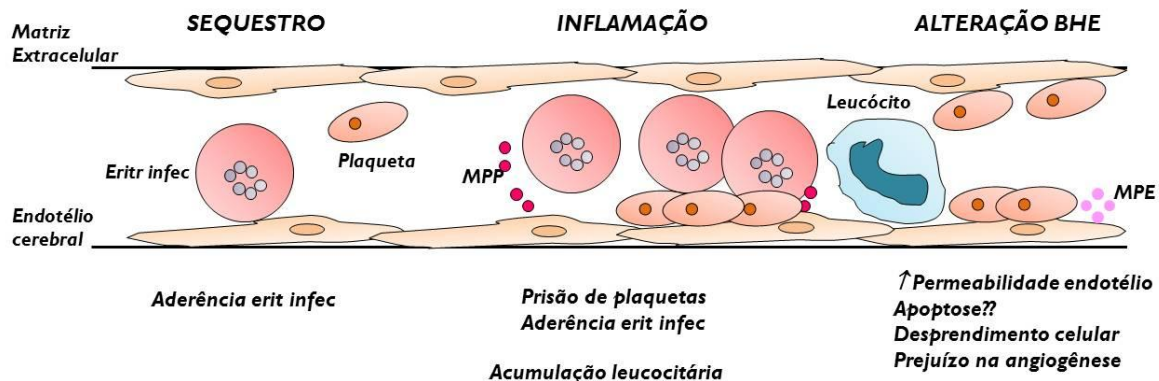


Figura 6. Representação esquemática do envolvimento de plaquetas e endotélio cerebral na patogênese da malária cerebral. Na fase inicial malária cerebral, elevados níveis de citocinas ativam o endotélio aumentando a ligação de células circulantes (plaquetas e eritrócitos infectados). Isso provoca ativação de novas moléculas de adesão promovendo maior ativação do endotélio, que libera mediadores ativadores de plaquetas. Plaquetas induzidas por eritrócitos infectados potencializam alterações no endotélio vascular. Abreviaturas: MPP, micropartículas derivadas de plaquetas; MPE, micropartículas derivadas de eritrócitos. Fonte: adaptado de Faille *et al.*, 2009a.

1.5 HEMATOLOGIA CLÁSSICA DE AVES

O sangue é o tecido de notória importância na fisiologia dos animais. Portanto, sua análise detalhada através do hemograma, é importante ferramenta complementar na clínica veterinária. A hematologia clínica aviária é relativamente nova e pode ser utilizada como auxiliar em diagnósticos e monitoramento de doenças, com informações sobre a relação parasito-hospedeiro, além de permitir aprofundamento no estudo dos mecanismos

fisiopatológicos de enfermidades provocadas por hemoparasitos como os plasmódios (Lucas & Jamroz, 1961; Silveira *et al.*, 2009).

O hemograma fornece informações sobre o eritrograma, leucograma e plaquetograma (que em aves corresponde aos trombócitos), e desta forma proporciona informações complementares sobre a saúde geral do animal, sendo exame laboratorial de primeira linha (Thrall *et al.*, 2007). Esse estudo auxilia na interpretação do estado geral, quer seja na análise dos quadros anêmicos, no acompanhamento de infecções por detalhamento do leucograma, além das avaliações iniciais de coagulação, pela análise de trombócitos (Jain, 1993).

Os leucócitos presentes na corrente sanguínea dividem-se de acordo com a morfologia nuclear e características citoplasmáticas. Em aves, os granulócitos são constituídos por eosinófilos, basófilos e heterófilos, enquanto os agranulócitos são constituídos por linfócitos e monócitos (Lucas & Jamroz, 1961; Campbell, 1995).

Infecções causadas por hemoparasitos podem alterar a densidade de certas células sanguíneas em animais (Campbell, 1995). Algumas espécies de plasmódios podem desencadear quadro de linfocitose, monocitose e redução do hematócrito provocado pela lise de hemácias durante a liberação dos parasitos (Campbell, 1995).

Assim como todas as aves, as galinhas possuem peculiaridades nos elementos figurados do sangue. Além das hemácias, os trombócitos, homólogos as plaquetas dos mamíferos, são nucleados. Entre leucócitos, destacam-se os heterófilos que possuem grânulos elípticos e conteúdo enzimático diferente do encontrado nas células homólogas de mamíferos, os neutrófilos (Ericsson & Nair, 1973). Tais características, morfologia e perfil enzimático de grânulos, são de grande valia nos estudos morfofuncionais dessas células.

Para uma melhor avaliação, a hematologia é dividida para estudos morfofuncionais de suas células: *série vermelha*, que incluem todos os dados relacionados

às hemácias, e *série branca*, onde se encontra todos os dados relacionados à células do sistema imunológico, além dos trombócitos.

1.5.1 Série vermelha

O eritrócito maduro é uma célula ovalada com núcleo também ovalado e em posição central. O citoplasma apresenta textura uniforme e coloração rosa-alaranjada (Lucas & Jamroz, 1961; Campbell, 1995). Essas células são facilmente deformáveis, podendo inclusive sofrer alterações no momento da realização da extensão sanguínea. Dessa forma, a presença de eritrócitos policromáticos (citoplasma mais basofílico que o citoplasma de eritrócitos normais) ou eritrócitos atípicos (alterações na morfologia celular ou morfologia nuclear), quando encontrados não devem ser considerados exclusivamente como indicativos de enfermidades (Lucas & Jamroz, 1961).

Os valores de eritrócitos (numero total de hemácias/mL) podem variar de acordo com sexo, idade, linhagem das aves (Lucas & Jamroz, 1961), além de alimentação e condição de saúde (Silveira *et al.*, 2009).

O hematócrito é a porcentagem do volume ocupado por hemácias do sangue sendo importante ferramenta na avaliação clínico-laboratorial, uma vez que valores muito baixos podem indicar anemia e valores muito altos, desidratação (Campbell, 1995; Mota, 1998). A concentração de hemoglobina pode ser medida como em mamíferos (método da cianometahemoglobina), sendo importante para confirmar presença de lise de células vermelhas (Campbell, 1995). A contagem do número total de hemácias é usada para detectar a quantidade de hemácias em um microlitro de sangue total, cujo objetivo é fornecer dados para o cálculo dos índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), que revelam o tamanho médio da hemácia e o conteúdo médio de hemoglobina por hemácia. Os índices

hematimétricos fornecem importantes informações sobre o tamanho e concentração da hemoglobina de uma hemácia média, além de auxiliar no diagnóstico e classificação das anemias (Lopes *et al.*, 2007).

A classificação das anemias em vários tipos, levando-se em consideração o tamanho e a morfologia das hemácias, permite determinar possíveis causas e mecanismos fisiopatológicos, sendo uma forma de avaliação morfológica da anemia a análise dos índices hematométricos, VCM e CHCM (Lopes *et al.*, 2007). Para o tamanho, os termos usados são normocítica (normal), macrocítica (maior) ou microcítica (pequena), e para as propriedades com base no teor da hemoglobina, normocrômica (normal) e hipocrômica (diminuída). A anemia macrocítica normocrômica resulta de assincronia da eritropoiese causada por alterações na maturação no estágio de pró-rubricito a rubricito basofílico, produzindo eritrócitos megaloblásticos na medula óssea (Lopes *et al.*, 2007). A anemia macrocítica hipocrômica pode ser observada durante perda aguda de sangue ou hemólise aguda, onde o grau de macrocitose e hipocromia depende da severidade da anemia, associada à intensidade da resposta eritropoiética medular (Lopes *et al.*, 2007). A reticulocitose em resposta à anemia aumenta o VCM e reduz o CHCM. A anemia normocítica normocrômica ocorre pela depressão seletiva da eritropoiese em doenças crônicas como infecções, doença renal crônica e algumas desordens endócrinas. Nestes casos, a resposta de reticulócitos está ausente ou insignificante. A anemia microcítica hipocrômica resulta de deficiência de ferro ou incapacidade de utilização do ferro para a síntese da hemoglobina (Lopes *et al.*, 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação morfológica das anemias.

<i>VCM</i>	<i>CHCM</i>	<i>Características</i>
	Hipocrômica	Sempre regenerativas Perda aguda de sangue/anemia hemolítica aguda
Macrocítica	Normocrômica	Anemias não regenerativas (diminuição do CHCM ainda não está presente) Deficiência de ácido fólico, FeLV (sem nenhuma reticulocitose), eritroleucemia, deficiência de vitamina B ₁₂
Microcítica	Hipocrômica	Deficiência de Ferro por perda: - Perda crônica de sangue: tumores, úlceras. - Parasitos: <i>Ancylostoma</i> , <i>Haemonchus</i>
Microcítica	Normocrômica	Deficiência de ferro por fatores que atuam no seu uso - Piridoxina, riboflavina, cobre
Microcítica	Normocrômica	Doença crônica
Normocítica	Normocrômica	Hemorragia e hemólises aguda - sem tempo para a resposta, deficiência de ferro (antes de predominar micrócitos), inflamação e neoplasias crônicas, deficiências endócrinas, aplasia eritróide seletiva, hipoplasia e aplasia da medula óssea, intoxicação por chumbo, pode não estar anêmico

1.5.2 Série branca

Nas aves sadias a população leucocítica é bastante parecida com a dos mamíferos. A leucocitose segue padrões tais quais os observados em mamíferos, com os leucócitos liberados na circulação geralmente quando maduros na ausência de doença.

As células do sistema imunológico presentes na corrente sanguínea das aves dividem-se de acordo com a morfologia nuclear e citoplasmática, os agranulócitos são constituídos por linfócitos e monócitos, enquanto os granulócitos são constituídos por

heterófilos (análogos aos neutrófilos de mamíferos), eosinófilos e basófilos (Thrall *et al.*, 2007).

Os monócitos das aves são morfológicamente similares aos dos mamíferos. Precusores de macrófagos, eles são as principais células fagocíticas do sistema imune das aves, qualidade anteriormente atribuída aos trombócitos que realizam a fagocitose em menor intensidade (Chang & Hamilton, 1979; DaMatta *et al.*, 1999; Qureshi, 2003).

Normalmente maiores que as hemácias, os monócitos têm formato arredondado e citoplasma azul vítreo com borda hialina, quando observados com coloração tipo Romanowsky. As principais características que diferenciam os monócitos dos linfócitos são a menor quantidade de heterocromatina e menor razão núcleo:citoplasma (Lucas & Jamroz, 1961). Grânulos azurofílicos podem estar presentes no citoplasma de monócitos de algumas espécies de aves e répteis (Montali, 1988). Os monócitos das aves possuem atividade fagocítica considerável, migrando para os tecidos onde se transformam em macrófagos e realizam sua atividade biológica de controle da inflamação e ação microbicida (Harmon *et al.*, 1993).

Os linfócitos possuem as mesmas funções das células homônimas de mamíferos e representam a população majoritária de leucócitos de algumas aves (Campbell, 2004). Linfócitos podem variar de tamanho, mas são menores do que as hemácias. O citoplasma é escasso e cora-se em azul vítreo, formando uma linha tênue ao redor do núcleo, entretanto pode aumentar de volume em linfócitos maiores. Projeções citoplasmáticas, pseudópodos, podem ser observados com frequência. O núcleo é redondo e centralizado, com sulcos raros, e cora-se acidofílicamente (Lucas & Jamroz, 1961). Outra característica peculiar dessas células é a alta razão núcleo:citoplasma (Campbell, 1995).

Os heterófilos estão envolvidos na resposta inflamatória primária de aves, porém quando estão sob estresse o número de heterófilos circulantes pode cair

drasticamente (Maxwell & Robertson, 1998). Alterações na morfologia desta célula são encontradas em situações de doença sendo denominadas “tóxicas”. Nesta situação a célula apresenta vacuolização citoplasmática, degranulação, rompimento dos grânulos, e degeneração nuclear (Campbell, 2004). Topp & Carlson (1972) demonstraram capacidade fagocíticas desses leucócitos.

Os eosinófilos de mamíferos exercem proteção contra infecções helmínticas, e estão freqüentemente associados a alergias, porém sua função permanece uma incógnita nas aves (Maxwell & Robertson, 1998). Diferente dos heterófilos, os eosinófilos possuem grande variação de tamanho, porém não de sua forma arredondada. O citoplasma possui coloração azul claro e o núcleo, reniforme, é basofílico com regiões mais escuras de heterocromatina (Lucas & Jamroz, 1961; Maxwell & Siller, 1972). No citoplasma estão contidos grânulos eosinofílicos redondos (Campbell, 2004).

Os basófilos são normalmente maiores que os heterófilos e eosinófilos. Embora pertençam a população minoritária de leucócitos circulantes, possuem importante função nos eventos inflamatórios, secreção de aminas vasoativas, e na hipersensibilidade cutânea. Aves sob situação de estresse podem apresentar basofilia (Maxwell & Robertson, 1995). Essas células possuem forma arredondada com grande variação de tamanho entre as espécies de aves. O citoplasma possui coloração basofílica, porém muitas vezes escondida pela grande quantidade de grânulos citoplasmáticos. Já o núcleo raramente apresenta lobulações, cora-se basofilicamente e freqüentemente encontra-se sob os grânulos (Campbell, 1995).

Os trombócitos maduros são células ovaladas menores e mais arredondadas que os eritrócitos, com núcleo grande em relação à menor quantidade de citoplasma, mas homogêneo e pode conter um ou mais grânulos vermelhos. São derivados de uma linhagem distinta de células encontradas no tecido hematopoiético. Essas células estão envolvidas

nos processos de homeostase e fagocitose e podem participar de funções de defesa do organismo, além da participação na coagulação sanguínea, e tendem a aglomerarem-se nos esfregaços sanguíneos dificultando sua contagem (Campbell, 1995; Schmidt *et al.*, 2007).

1.6 BIOQUÍMICA SÉRICA DE AVES

O perfil bioquímico sérico é uma abordagem de avaliação fisiológica, complementar ao hemograma. Ambos são importantes ao diagnóstico veterinário (Harr, 2002). O perfil bioquímico das aves é tomado como ferramenta que apenas é usada para a pesquisa ou em trabalhos científicos e poucas vezes se considera como técnica diagnóstica útil para a clínica aviária (Schmidt *et al.*, 2007).

O monitoramento das funções renais, hepáticas e musculares, do metabolismo da glicose e da concentração de íons plasmáticos possibilita o entendimento do real efeito do manejo e doenças sobre a fisiologia das aves. Em frangos de corte, rações contaminadas com aflatoxinas, ou até mesmo desbalanceadas, podem alterar a funcionalidade do fígado e rins, e acarretar na mudança das concentrações das proteínas plasmáticas (Quezada *et al.*, 2000; Oguz, 2002). Os principais exames bioquímicos utilizados para as aves são: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FAL), Creatina-cinase (CK), Lactato desidrogenase (LDH), Uréia, Ácido úrico e creatinina (Lumeij, 1997; Campbell, 2004).

A função renal das aves pode ser avaliada pela mensuração sérica de ácido úrico e uréia, sendo o primeiro, um parâmetro mais confiável. Seu aumento sérico acontece quando menos de 30% do rim está funcional (Lumeij, 1997; Campbell, 2007). A concentração sanguínea de creatinina é baixa em aves e tem pouco valor diagnóstico, pois

a creatina é excretada pelos rins das aves antes de ser convertida em creatinina (Campbell, 2007). O ácido úrico é o produto final do metabolismo do nitrogênio mais importante nas aves. Como sua eliminação é pouco influenciada pelo fluxo da urina e estado de hidratação da ave, o ácido úrico sanguíneo aumenta somente quando existem causas pré-renais muito severas ou quando o dano tubular é extenso (Lumeij, 1997; Fudge, 2000). Em geral, o seu aumento sérico indica alteração da função renal, devido a diversas causas. Como as aves são uricotélicas, há baixa concentração de uréia no seu plasma. A uréia é formada no fígado como subproduto do metabolismo das proteínas. É excretada por filtração glomerular, que depende da condição de hidratação da ave (Lumeij, 1997; Campbell, 2007).

Nas aves, as provas de função hepática estão divididas em testes de enzimas hepáticas que refletem lesão hepatocelular (como aspartato aminotransferase - AST), aumento na produção enzimática conseqüente à colestase e testes funcionais do fígado ou metabólitos, como o colesterol e as proteínas (Schmidt *et al.*, 2007). A AST é uma enzima citoplasmática e mitocondrial presente em vários tecidos como fígado, músculo esquelético, músculo cardíaco, cérebro e rim, sendo que em todas as espécies domésticas, inclusive nas aves, a sua atividade é alta no fígado. Portanto, na injúria hepática aguda ou crônica, a atividade sérica de AST está elevada (Tennant, 1997; Campbell, 2007). Entretanto, Fudge (2000) explica que o fígado em estágio final, como na severa fibrose ou lipidose, pode produzir pouco extravasamento hepatocelular, resultando em níveis de AST normais ou, em alguns casos, diminuídos. Portanto, a elevação dos níveis sérico-enzimáticos da AST é decorrente de lesão dos hepatócitos, resultante de necrose ou de alterações na permeabilidade da membrana celular, e pode ser atribuída à disfunção hepática recente (Kaneko *et al.*, 1997). Porém, esta não é uma enzima específica de lesão hepática, podendo estar aumentada em lesões musculares, juntamente com aumento da

creatina cinase (CK) (Schmidt *et al.*, 2007). A CK é uma enzima músculo-específica e o aumento da sua atividade plasmática pode se originar de lesão de célula muscular ou de esforço físico exagerado (Lumeij, 1997; Campbell, 2007). A mensuração da atividade plasmática da CK pode ser útil para determinar se o aumento da atividade da AST decorre de lesão muscular ou hepatocelular: elevação na atividade sérica da AST não acompanhada de CK aumentada sugere a existência de doença hepática (Campbell, 2007).

FAL são um grupo de enzimas encontradas principalmente no fígado e osso (Tennant, 1997). Há também pequenas quantidades produzidas pelos rins. Dessa forma, é medido a quantidade total de FAL liberada desses tecidos para o sangue. A importância principal da medição da FAL é verificar a possibilidade de doença hepática (Tennant, 1997). Quando o fígado não está funcionando corretamente, a FAL não é excretada através da bile e é liberada na corrente sanguínea. Assim, a FAL é importante como medida da integridade do sistema hepático (Trhall *et al.*, 2007).

A LDH é uma enzima cujo nível eleva em danos teciduais. Assim, os níveis de LDH podem indicar hemólise, que pode ocasionar anemia hemolítica. Devido a sua distribuição aproximadamente igual em diferentes órgãos, um aumento na atividade da LDH pode dar indicações sobre doenças do fígado (ou necrose ocasionada por agentes tóxicos ou infecções), sangue e lesões dos músculos esqueléticos (Maitland & Newton, 2005). Os testes bioquímicos estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Bioquímica sérica: testes e suas indicações de funcionalidade.

<i>Tipo</i>	<i>Teste</i>	<i>Monitoramento de:</i>
Enzima	Aspartato transferase (AST)	Função hepática
	Alanina transferase (ALT)	
	Fosfatase alcalina (FAL)	
Metabólito	Ácido úrico	Função renal
	Uréia	
	Creatinina	
Enzima	Creatina cinase (CK)	Função muscular
Enzima	Lactato desidrogenase (LDH)	Dano tecidual

Em trabalho anterior procuramos estabelecer o modelo de malária cerebral aviária (Macchi *et al.*, 2010), onde verificamos alterações histopatológicas no cérebro, como gliose e infiltrados de mononucleares no endotélio, além de vasos ocluídos com eritrócitos em animais infectados dos animais infectados e um aumento na produção de nitrito por macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de animais infectados, evidenciando o envolvimento do NO na infecção. Diante do exposto, este trabalho visa compreender mecanismos envolvidos na patogênese da malária, em animais tratados e não tratados com aminoguanidina, inibidor seletivo da enzima NOS induzida.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Estudar o papel do NO e alterações hematológicas, bioquímicas e patológicas durante a infecção da malária aviária, em modelo experimental *in vivo*.

Objetivos específicos:

- Verificar sobrevivência e desenvolvimento de parasitemia em aves infectadas com *Plasmodium gallinaceum* e tratadas ou não com aminoguanidina.

- Comparar os perfis hematológicos e bioquímicos séricos de galinhas infectadas com o *P. gallinaceum* tratadas ou não com aminoguanidina ao longo da infecção.

- Comparar a histopatologia de órgãos (cérebro, fígado e baço) de galinhas infectadas com o *P. gallinaceum* 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.

- Avaliar a morfologia de trombócitos em esfregaços sanguíneos e em cultura, de galinhas infectadas com o *P. gallinaceum* tratadas ou não com aminoguanidina, em diferentes parasitemias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CEUA/UENF) em 16/07/2010, sob o protocolo nº 100/2010.

3.2 Animais

Para a infecção experimental foram utilizados *Gallus gallus* da linhagem Cobb, com um dia pós-eclosão, vacinados contra Bouda aviária e doença de Marek, adquiridos na Granja Caipixaba, em Marechal Floriano-ES. Na fase pré-inoculação, as aves foram mantidas no aviário da UENF. Até os 21 dias de vida, foram mantidas em caixas de madeira, com temperatura monitorada (1º ao 8º dia, entre 32º e 35ºC; 9º ao 15º dia, 30º e 32ºC; 16º ao 21º dia, 27º e 29ºC) e iluminação contínua, com água e ração (PURINA®, livre de coccidiostático) *ad libitum*. A limpeza das caixas e troca da “cama” de maravalha foi realizada diariamente. Após 21 dias de vida, com centro termorregulador estabelecido, as aves foram transferidas para gaiolas e mantidas em temperatura ambiente. A inoculação foi feita aos 35 dias de vida.

3.3 Cepa de *Plasmodium gallinaceum*

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*).

3.4 Grupos experimentais

Para os experimentos de sobrevivência, curva de parasitemia, controle de temperatura, hematologia e bioquímica, as aves foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos experimentais: *G1* (n=5), aves não infectadas; *G2* (n=5), aves não infectadas tratadas com aminoguanidina; *G3* (n=12), aves infectadas e *G4* (n=12), aves infectadas tratadas com aminoguanidina. Para coleta de sangue, as aves foram divididas em subgrupos “a” e “b”, e utilizadas em dias alternados, o que diminui o estresse no animal (Figura 7). Foi feito uma repetição do experimento.

Para os experimentos de contagem e morfologia de trombócitos em cultura, produção de NO (nitrito no plasma e atividade da enzima NOS no cérebro) e histopatologia de órgãos, as aves foram distribuídas da seguinte maneira: *G1* (n=3), *G2* (n=3), *G3* (n=9) e *G4* (n=12) e sacrificadas em parasitemias conhecidas.

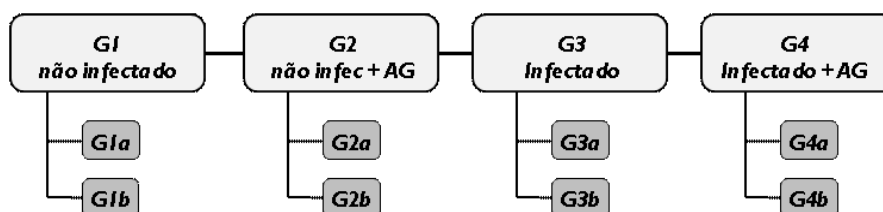


Figura 7. Desenho dos grupos experimentais e divisão dos subgrupos para coleta de sangue. As divisões “a” e “b” correspondem aos subgrupos para coleta de sangue.

3.5 Tratamento com aminoguanidina (AG) e infecção com *Plasmodium gallinaceum*

O tratamento com AG foi iniciado dois dias antes da infecção com o parasito, com dose de 25mg/Kg, administrada diariamente por via intraperitoneal. A dose foi obtida com base em estudos anteriores (Wideman *et al.*, 2005; 2006). A AG foi adquirida na forma bicarbonada (SIGMA), pouco solúvel em meio aquoso. A diluição foi feita na

concentração 40 mg/mL com solução devidamente titulada com H₂SO₄ concentrado até o pH 2,0, produzindo a forma hemissulfatada, solúvel em meio aquoso. Após diluição, a correção de pH (para 7,0) foi feita após titulação com solução de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio (5N), de acordo com protocolo obtido pela SIGMA. A correção da concentração foi feita de acordo com o volume utilizado de ácido sulfúrico e carbonato/bicarbonato de sódio (Vieira, 2007). A administração da AG foi aceita e teve boa tolerância pelos animais.

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 5×10^6 eritrócitos parasitados, em volume final de 50 µL. 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).

3.6 Determinação da parasitemia

Para determinar a evolução da parasitemia, extensões sanguíneas foram feitas diariamente a partir de gotas sanguíneas obtidas com o corte da unha do animal. As extensões sanguíneas foram fixadas em metanol absoluto por 2 minutos e cobertos com Giemsa (10%) 30 minutos. A porcentagem de hemácia parasitada foi estimada através da contagem do número de parasitos em 1000 hemácias, em diferentes campos, por microscopia de luz em objetiva de 100x.

3.7 Coleta de sangue

A partir do 4º dpi, foi realizada coleta de sangue por venopunção da asa, com auxílio de seringas e agulhas de insulina, lubrificadas com anticoagulante EDTA (para provas hematológicas) e sem anticoagulante (para provas bioquímicas), a cada dois dias, em sistema de rodízio das aves (subgrupos) por um período de 28 dpi, até restabelecimento das aves restantes, totalizando 14 coletas, uma vez que no dia 0 foi coletado sangue de alguns animais para servir de valor de base (Figura 8).

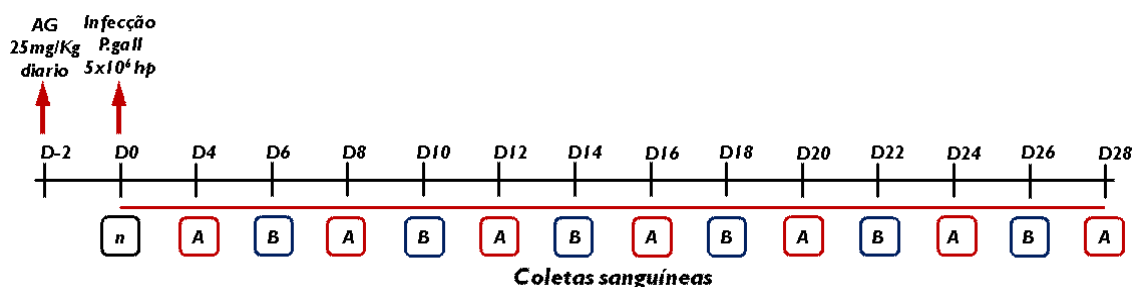


Figura 8. Esquema cronológico do experimento, mostrando o início do tratamento com AG, a inoculação com *Plasmodium gallinaceum* e os dias de coleta de sangue, evidenciando o sistema de rodízio de aves (subgrupos A e B). No D0, foi coletado sangue de um “n” amostral dentro dos grupos. A partir do D4, a coleta foi feita de dois em dois dias, em sistema de rodízio com os subgrupos A e B.

3.8 Hematologia clássica

Foram realizadas as seguintes provas hematológicas para auxiliar no monitoramento dos quadros anêmicos (hematócrito, dosagem de hemoglobina, hematimetria) e da infecção (contagem total de leucócitos e de trombócitos, contagem diferencial de leucócitos).

a) *Hematócrito*: para obter a porcentagem de hemácias no volume total de sangue, foi utilizada a técnica de microhematócrito. O sangue foi centrifugado em tubo capilar por 5 minutos a 11000 rpm em centrífuga de microhematócrito (modelo SPIN 1000).

b) *Dosagem de hemoglobina*: para verificar a lise de hemácias através da hemoglobina, foi utilizado o método de reação da cianometahemoglobina. O sangue foi diluído (1:250) em reagente de cor (kit Labtest®). Após homogeneização e incubação por 5 minutos, a amostra foi centrifugada (3000 rpm por 5 minutos), para sedimentação dos núcleos das hemácias, para evitar interferência na leitura. A leitura foi feita em $\lambda=540\text{nm}$, no espectrofotômetro semi-automático (BTS-310). O valor obtido foi expresso em mg/dL.

c) *Hematimetria*: para obter o número total de hemácias, o sangue foi diluído 1:200 (10 μL de sangue em 2mL de formaldeído 4% em PBS) e, após homogeneização, foi feita contagem na câmara de Neubauer em cinco quadrados médios. O resultado foi multiplicado por 10000/ μL .

d) *Leucometria*: para contagem total de leucócitos e trombócitos, o sangue foi diluído 1:100 (10 μL de sangue diluído em 1mL de formaldeído 4% em PBS e corante azul de cresil brilhante) e, após homogeneização, foi feita contagem na câmara de Neubauer nos quatro quadrados grandes médios. Todas as células não-hemácias foram contadas. O resultado foi multiplicado por 250/ μL . Na extensão sanguínea, foi obtido o percentual de trombócitos em relação a leucócitos, após contagem dessas duas células (n=100). O número absoluto de cada célula foi obtido a partir do percentual observado na extensão sanguínea. A contagem diferencial foi feita em extensões sanguíneas coradas com Giemsa. A morfologia celular foi avaliada e contada utilizando o microscópio Zeiss Axioplan®.

e) *Índices hematimétricos*: com os valores obtidos acima, foram calculados o Volume Corpuscular Médio (VCM) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), que permite evidenciar o tipo de anemia presente (Jain, 1993).

3.9 Funções hepática e renal

Para avaliar as funções hepática e renal das aves entre os grupos experimentais, foi feita dosagem bioquímica de enzimas e metabólitos em amostras de soro. A obtenção do soro foi feita após centrifugação do sangue, obtido sem anticoagulante, por 5 minutos a 2600g. O soro foi aliquoteado e, em seguida, congelados à -70°C , para posterior ensaios bioquímicos. Os ensaios bioquímicos foram:

a) *Aspartato aminotransferase (AST)* e *Alanina aminotransferase (ALT)*: para ensaio de cada enzima, 50 μL de amostra foi adicionada em 500 μL do respectivo reagente de trabalho (kit Labtest®). Após homogeneização, a amostra foi colocada no espectrofotômetro semi-automático (BTS-310), para incubação e leitura em $\lambda=340\text{nm}$. O valor obtido foi expresso em U/L.

b) *Lactato desidrogenase (LDH)*: para ensaio da enzima, 10 μL de amostra foi adicionada em 500 μL do reagente de trabalho (kit Labtest®). Após homogeneização, a amostra foi colocada no espectrofotômetro semi-automático (BTS-310), para incubação e leitura em $\lambda=340\text{nm}$. O valor obtido foi expresso em U/L.

c) *Fosfatase alcalina (FAL)*: para ensaio da enzima, 10 μL de amostra foi adicionada em 500 μL do reagente de trabalho (kit Labtest®). Após homogeneização, a amostra foi colocada no espectrofotômetro semi-automático (BTS-310), para incubação e leitura em $\lambda=405\text{nm}$. O valor obtido foi expresso em U/L.

d) *Ácido úrico*: para ensaio, 10 μL de amostra foi adicionada em 500 μL do reagente de trabalho (kit Labtest®). Após homogeneização, a amostra foi colocada no espectrofotômetro semi-automático (BTS-310), para incubação e leitura em $\lambda=405\text{nm}$. O valor obtido foi expresso em mg/dL.

e) *Uréia*: para ensaio, 10 μL de amostra foi adicionada em 500 μL do reagente de trabalho (kit Labtest®). Após homogeneização, a amostra foi colocada no

espectrofotômetro semi-automático (BTS-310), para incubação e leitura em $\lambda=350\text{nm}$. O valor obtido foi expresso em mg/dL.

f) Creatinina: para ensaio, 50 μL de amostra foi adicionada em 400 μL do reagente de trabalho (soda) e 100 μL de ácido pícrico (kit Labtest®). Após homogeneização, a amostra foi colocada no espectrofotômetro semi-automático (BTS-310), para incubação e leitura em $\lambda=350\text{nm}$. O valor obtido foi expresso em mg/dL.

g) Colesterol: para o ensaio, 10 μL de amostra foi adicionada em 1000 μL do reagente de trabalho (kit Labtest®). Após homogeneização, a amostra foi incubada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias foram determinadas em 505nm, em espectrofotômetro semi-automático (BioPlus 200). O valor obtido foi expresso em mg/dL.

3.10 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 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 foi mensurado pelo reagente de Griess (Green *et al.*, 1982). Após redução a nitrito, 100 μL da amostra foi colocada em uma placa de 96 poços, onde foi acrescentado 100 μL 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 nitrato de sódio a concentrações conhecidas, e os valores expressos em μM .

3.11 Obtenção de trombócitos em cultura

Trombócitos de animais não-infectados e infectados, tratados ou não com AG em diferentes parasitemias foram cultivados em lamínulas, por 1h e 24h, obtidos a partir do sangue periférico das aves, como descrito por DaMatta *et al* (1998). Foram coletadas, por punção cardíaca, amostras de 2ml de sangue, que foram diluídas (1:1), em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) sem soro. Para obtenção dos trombócitos, as amostras foram passadas em um colchão de Percoll a 60% (índice de refração 1,347), onde foram centrifugadas a 600g, 25°C por 20 minutos. Após centrifugação, o plasma foi descartado e os leucócitos, identificados através de um anel formado devido o gradiente de concentração, foram transferidos para outro tubo. As células foram então lavadas duas vezes com solução de Hank (500 g, 4 °C, 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 2×10^7 células/ml, onde 150 μl foi plaqueada em lamínula em placa de 24 poços. Após 1h em estufa a 37 °C e atmosfera 5% de CO_2 , metade das lamínulas foram recolhidas (trombócitos de 1h) e as lamínulas restantes foram lavadas com Hank, para remoção das células não-aderentes, e adicionado DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24h de cultivo, as lamínulas foram recolhidas.

3.12 Fixação e coloração dos trombócitos

As lamínulas recolhidas foram fixadas em formaldeído 4% tamponado em PBS, por 20 minutos. Após fixação, as lamínulas foram lavadas 2x com PBS e coradas com Giemsa durante 15 minutos. As lamínulas foram lavadas com PBS, para posterior desidratação em álcool, diafanização em xilol e montagem da lâmina com Entellan® para observação em microscopia óptica.

3.13 Análise morfológica de trombócitos por imunofluorescência

As lamínulas fixadas em formaldeído 4% tamponado em PBS foram lavadas com PBS para remoção do fixador e incubadas com cloreto de amônia 10mM por 30 minutos. Após incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS contendo BSA a 1,5% e incubadas por 1h no anticorpo primário (diluição 1:10). O anticorpo primário (anti-trombócito 11C3) foi obtido a partir do sobrenadante de culturas de hibridomas cedido por Colette Kanellopoulos-Langevin, Universités Paris, França. Após incubação com anticorpo primário, as lamínulas foram lavadas com PBS, e em seguida com BSA, para posterior incubação no anticorpo secundário (diluição 1:100). O anticorpo secundário utilizado foi o anti-mouse/TRITC. Após incubação, as lamínulas foram lavadas 8x com PBS e montadas com ProlongGold®. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan®.

3.14 Histopatologia de órgãos

Após eutanásia dos animais, fragmentos de órgãos (cérebro, fígado e baço) foram obtidos e fixados em formol 10% tamponado em PBS. As amostras foram processadas de acordo com técnica de rotina de anatomia patológica, que consiste na passagem do tecido em diversas diluições de álcool, iniciando com álcool 70%,

progredindo até o etanol absoluto 100%, duas passagens em xilol à temperatura ambiente seguida da imersão em banhos de parafina a 60°C e posterior inclusão e formação de blocos, que após resfriados foram seccionados utilizando micrótomo rotativo. Os cortes de 5µm de espessura foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina.

3.15 Análise morfológica das células sanguíneas, trombócitos e estudo histopatológico

A análise morfológica das células foi feita através da observação das extensões sanguíneas (obtidas nos dias de coleta, fixadas em metanol e coradas com Giemsa) em campo claro no microscópio óptico Zeiss Axoplan[®]. As células foram documentadas digitalmente no programa AnalySys[®], acoplado ao microscópio.

3.16 Análise estatística

Valores de temperatura e hematócrito foram correlacionados com parasitemia por regressão linear e correlação de Pearson's. Valores hematológicos, bioquímicos e de nitrito foram analisados por ANOVA e teste de Fisher. Todos os testes foram realizados no programa estatístico BioEstat versão 5.0. Foi feita repetição de todos os experimentos e os gráficos foram construídos com a média de cada grupo.

4. RESULTADOS

A infecção com *P. gallinaceum* foi precedida pelo tratamento com aminoguanidina (AG) em um grupo de galinhas, com continuidade do tratamento após a infecção. A partir do 4º dpi, a parasitemia foi continuamente monitorada, porém eritrócitos infectados só foram encontrados a partir do 6º dpi, tanto nas aves tratadas e não tratadas com AG. No grupo tratado com AG, 33% morreram ao longo do experimento, enquanto que no grupo não tratado a mortalidade foi de 66% (Figura 9A). Manifestações clínicas típicas da malária aviária, como apatia, falta de apetite, caquexia, palidez da crista e membros (indicativo de anemia), foram observadas. Alguns animais também apresentaram nistagmo e contração muscular involuntária da face (um animal do grupo não tratado apresentou vocalização com ritmo anormal), recolhimento do corpo em posição com o bico voltado para baixo e febre. Importante mencionar que todas as manifestações clínicas observadas foram menos evidentes nas aves tratadas com AG.

Dentre as aves que cronificaram durante o experimento, o maior pico de parasitemia foi observado no grupo tratado com AG (Figura 9B). Além disso, as aves tratadas com AG que morreram em consequência da infecção apresentaram parasitemia cerca de 34% maior quando comparadas com as aves não tratadas (Figura 9C-D). Em conjunto, estes resultados indicam que as aves tratadas com AG possuem uma melhor sobrevida à infecção, apesar da maior parasitemia apresentada.

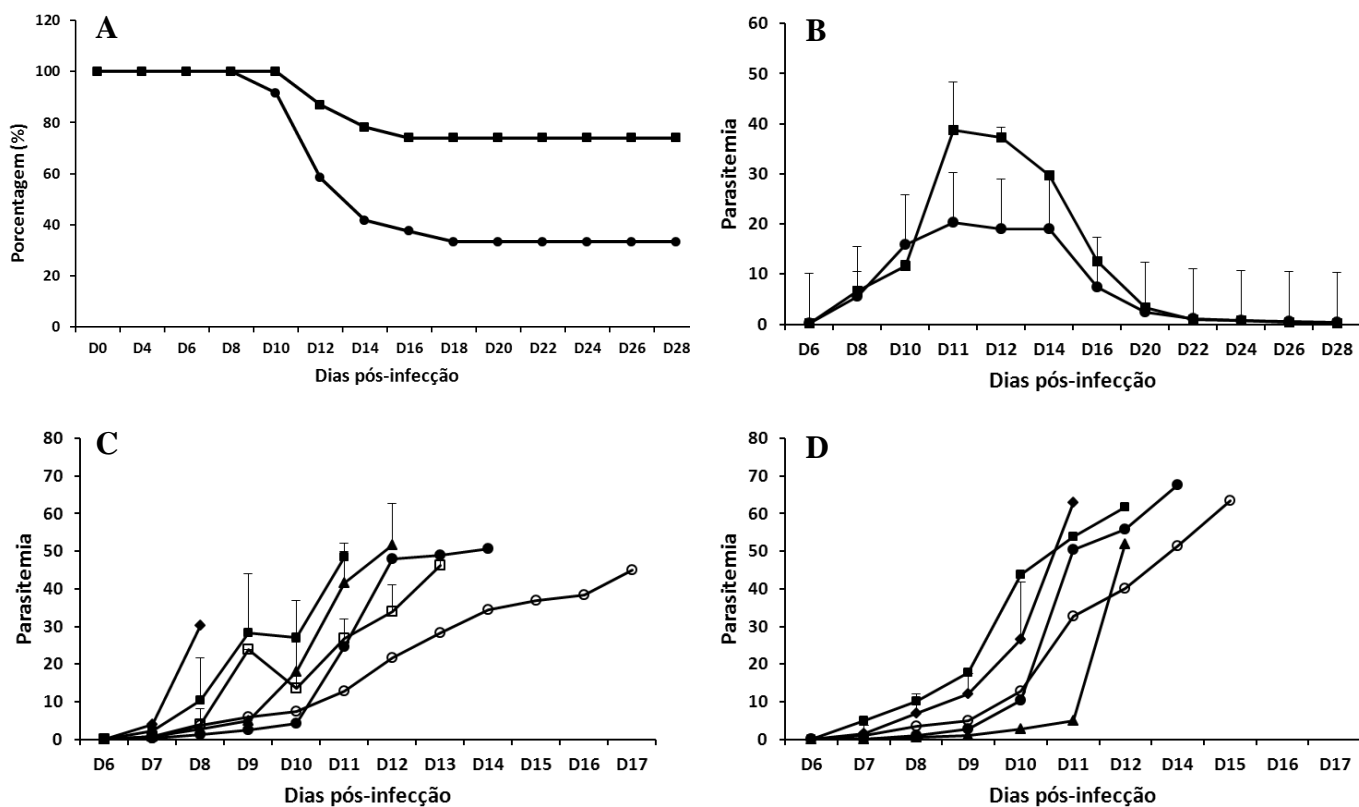


Figura 9. Sobrevida e parasitemia de aves infectadas com *Plasmodium gallinaceum*. (A) Sobrevida de aves infectadas tratadas (■) ou não (●) com aminoguanidina. (B) Parasitemia de aves crônicas tratadas (■, n=17) ou não (●, n=8) com aminoguanidina. (C) Parasitemia de aves não tratadas com aminoguanidina até o dia da morte (◆, n=1; ■, n=6; ▲, n=5; □, n=2; ●, n=1; ○, n=1). (D) Parasitemia de aves tratadas com aminoguanidina até o dia da morte (◆, n=1; ■, n=2; ▲, n=1; ●, n=1; ○, n=1).

Durante os experimentos, as aves foram examinadas por hematologia clássica, e os valores obtidos foram relacionados com a parasitemia do animal e agrupados em intervalos de parasitemias. Embora os valores da série vermelha não sejam estatisticamente diferentes entre os dois grupos de aves, uma tendência para valores normais foi detectada nas aves tratadas com AG (Figura 10). Esses parâmetros indicam que a infecção com *P. gallinaceum* induz anemia macrocítica hipocrômica. Este resultado indica que, apesar das aves tratadas com AG apresentarem maior parasitemia, tiveram valores próximos dos parâmetros fisiológicos normais para os glóbulos vermelhos.

Observações dos esfregaços de sangue periférico de galinhas com parasitemias acima de 35% revelaram eritrócitos imaturos em processo de divisão celular (Figura 11A-D). Apesar da grande maioria de eritrócitos infectados estarem no estágio maduro (Figura 11E), também foram encontrados eritrócitos imaturos em diferentes fases do ciclo celular com parasitos (Figura 11F-H). Nenhuma diferença foi encontrada entre aves do grupo tratado e grupo não tratado com AG.

As extensões sanguíneas mostraram que não só eritrócitos estavam infectados com *P. gallinaceum* (Figura 11), mas também monócitos (Figura 12A-B), heterófilos (Figura 12C-D) e trombócitos (Figura 12E-F).

A contagem total de leucócitos revelou uma tendência a leucopenia nas aves tratadas e não tratadas com AG, havendo tendência ao aumento do número de leucócitos nas aves com maior parasitemia (Figura 13A). As aves que cronificaram recuperaram a normalidade no número de leucócitos (Figura 13A). O número total de trombócitos mostrou uma trombocitopenia significativa com o aumento da parasitemia (Figura 13B). Além disso, as aves tratadas com AG apresentaram valores superiores de trombócitos em relação às aves não tratadas, sendo estatisticamente diferente em alta parasitemia (Figura 13B).

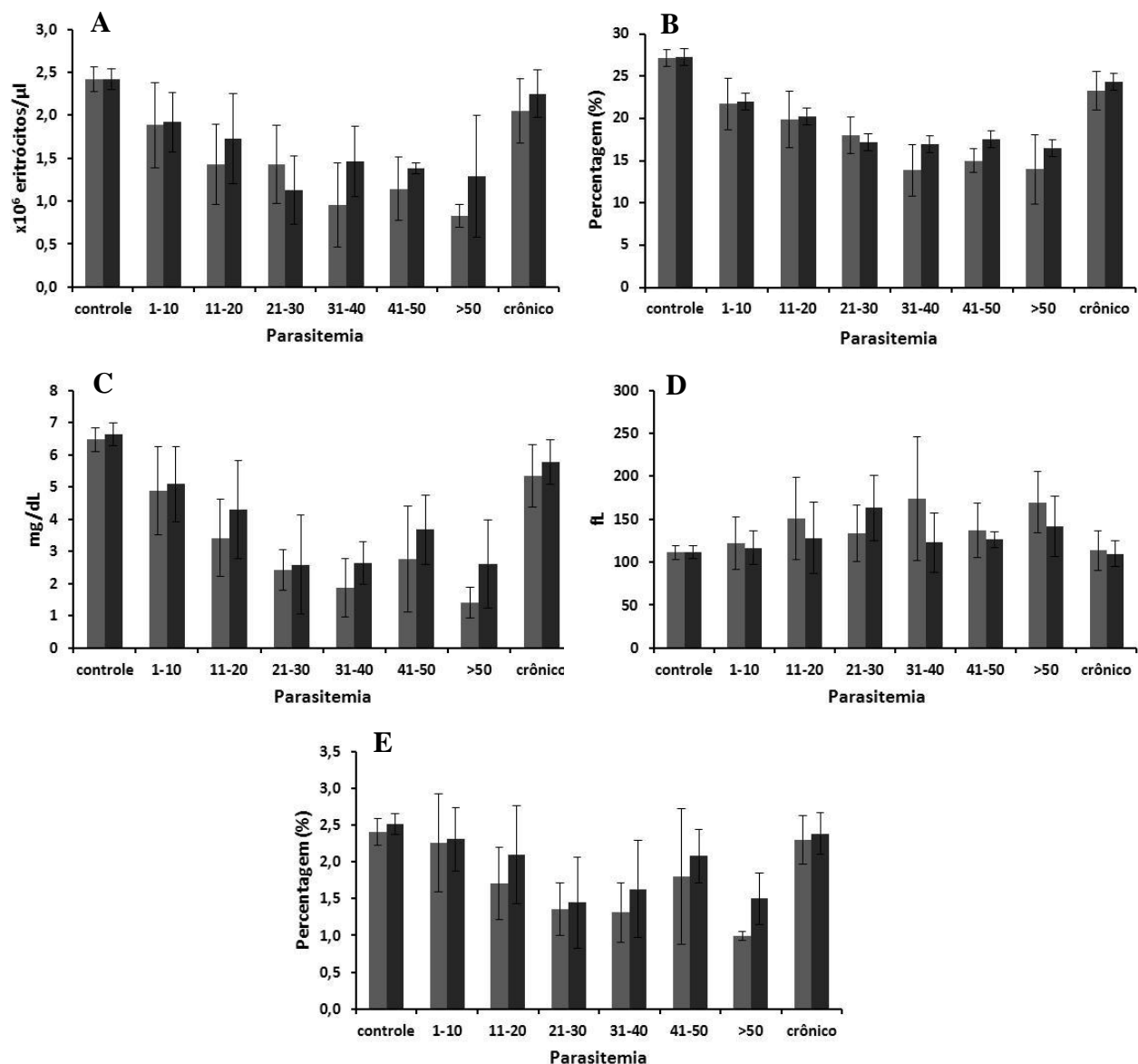


Figura 10. Parâmetros hematológicos da série vermelha de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* tratadas (barras escuras) ou não (barras claras) com aminoguanidina, agrupadas por intervalos de parasitemia. (A) Número de eritrócitos. (B) Hematócrito. (C) Concentração de hemoglobina. (D) Volume corpuscular médio (VCM). (E) Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

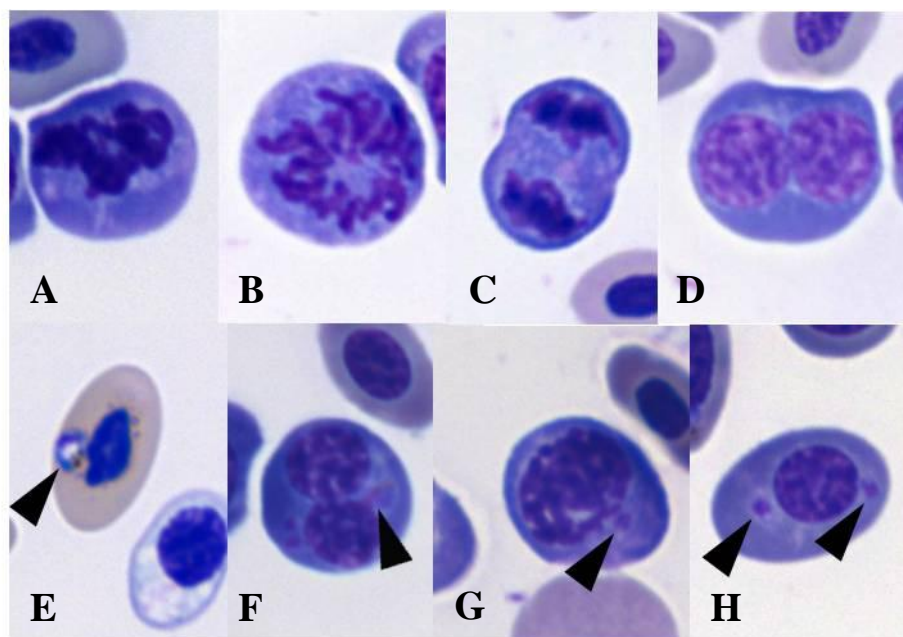


Figura 11. Eritrócitos de aves infectadas com *Plasmodium gallinaceum*. Presença de eritrócitos em fases da divisão celular, além de eritrócitos maduros e imaturos infectados. Eritrócito em prófase (A), prometáfase (B), anáfase (C) e telófase (D). Eritrócitos maduro (E) e imaturo (F, G, H) infectados (cabeças de seta).

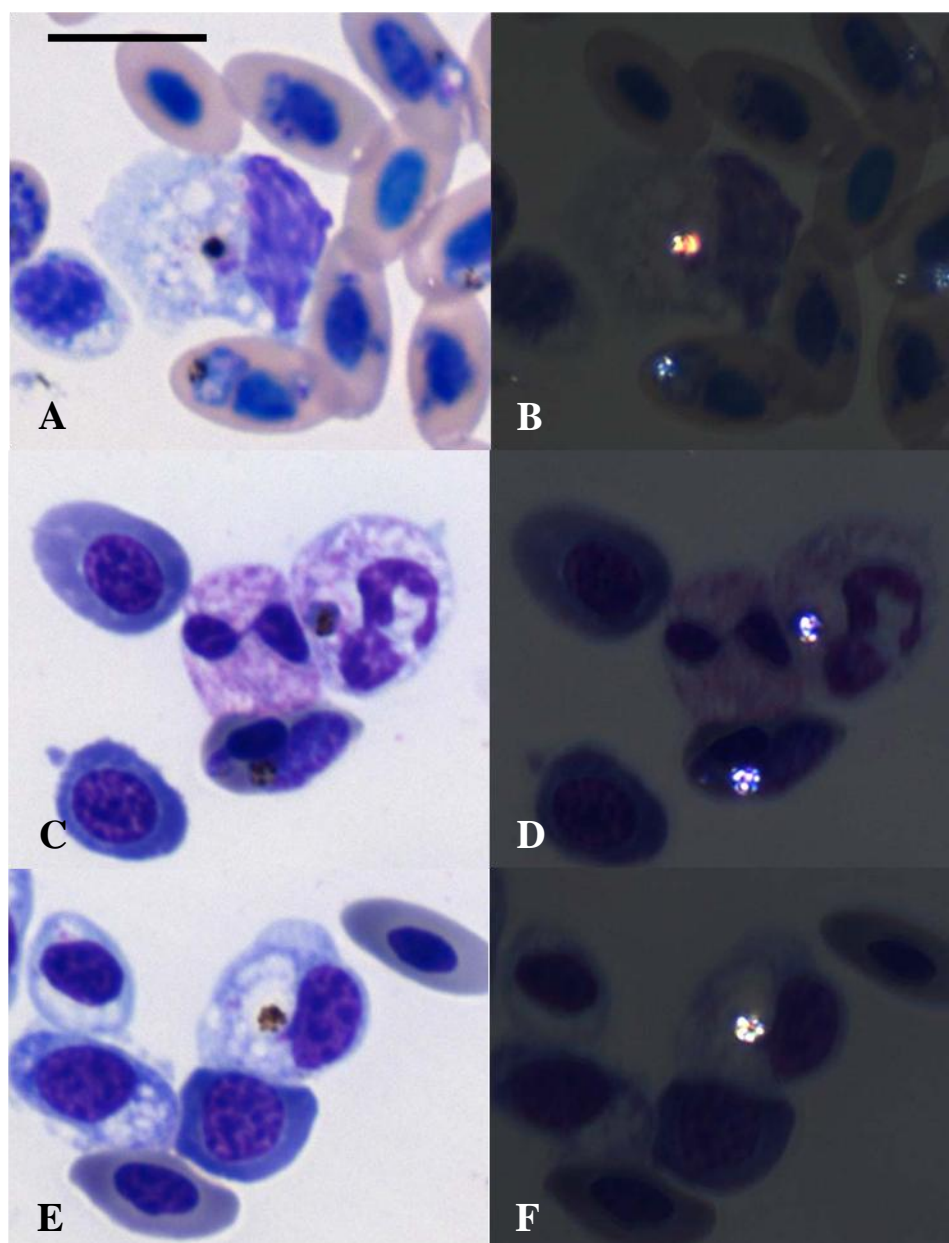


Figura12. Monócitos (A, B), heterófilos (C, D) e trombócitos (E, F) infectados com *Plasmodium gallinaceum*. (A, C, E) Leucócitos de extensões sanguíneas corados com Giemsa. (B, D, F) Mesmo campo observado por microscopia polarizada, evidenciando a birrefringência do pigmento malárico. Barra = 10 μm .

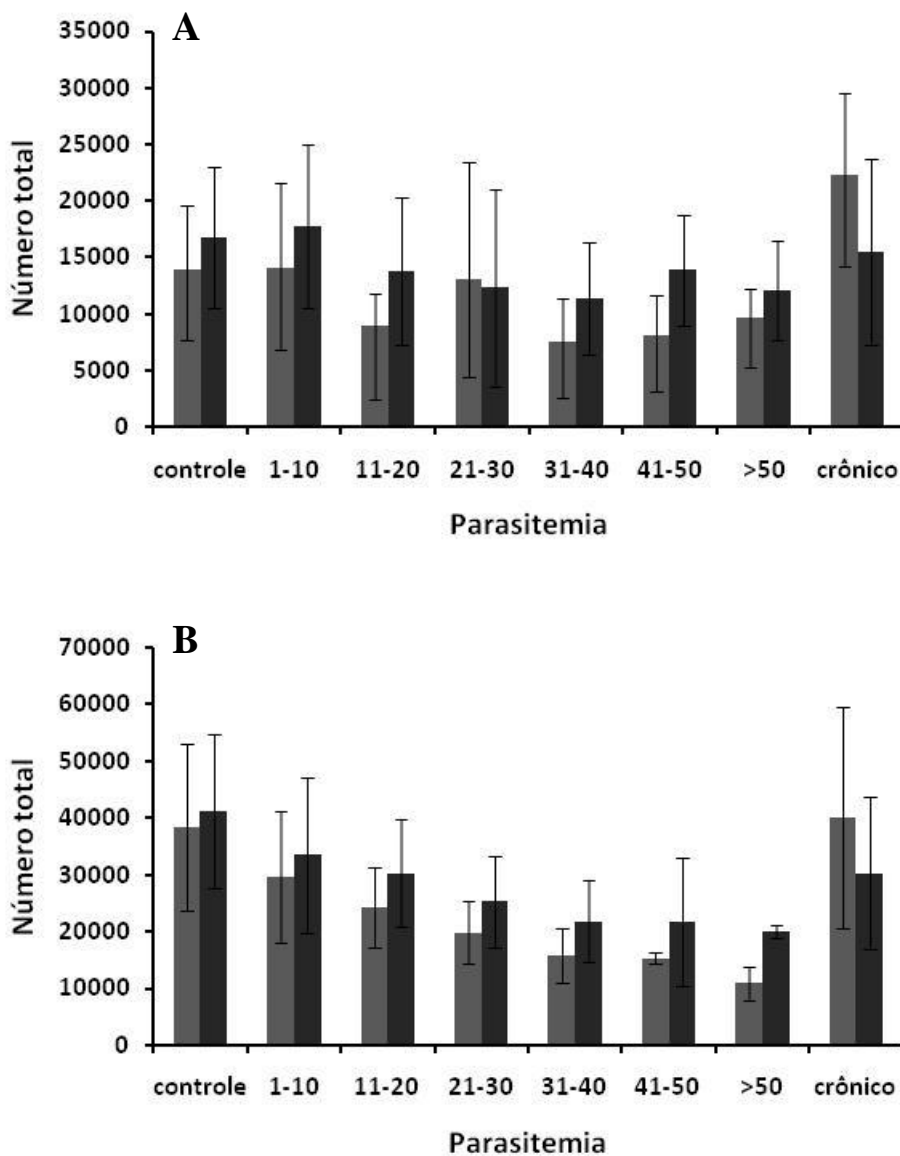


Figura 13. Número absoluto de leucócitos totais (A) e trombócitos (B) de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* tratadas (barras escuras) ou não (barras claras) com aminoguanidina.

A contagem diferencial de leucócitos mostrou proporção bem maior de linfócitos, em relação a heterófilos e monócitos (três tipos celulares mais abundantes), em ambos os grupos, tratado e não tratado com AG (Figura 14A-C). Em relação aos linfócitos, houve diminuição no número total quando em alta parasitemia, observada nos dois grupos de animais, tratado e não tratado com AG (Figura 14A). No entanto, essa diminuição no grupo não tratado com AG, ocorreu a partir de 31% de parasitemia, enquanto que no grupo tratado com AG, só ocorre a partir de parasitemia mais alta (41%). Foi observado uma monocitopenia no grupo não tratado em relação ao grupo tratado com AG, em parasitemias baixas e moderadas, enquanto que em parasitemias elevadas, houve uma monocitose no grupo não tratado em relação ao grupo tratado com AG (Figura 14B). Uma diminuição do número de heterófilos (segmentados e bastonetes) foi observada em parasitemias moderadas e altas, em ambos os grupos, tratado e não tratado com AG, que foi recuperada nos animais com infecção crônica (Figura 14C).

As células brancas, monócitos, linfócitos e heterófilos apresentaram morfologia alterada durante o curso da infecção com o aumento da parasitemia. Alterações morfológicas não foram observadas em eosinófilos. Monócitos de galinhas não infectadas apresentaram núcleo com formato reniforme e coloração roxa, citoplasma com coloração azul claro com poucas áreas em azul escuro (Figura 15A). Em galinhas com moderada e alta parasitemia, os monócitos aumentaram de tamanho e apresentaram mais vacúolos e ainda, citoplasma com mais áreas coradas em azul escuro (Figura 15B-C). Os linfócitos de galinhas não infectadas apresentaram-se pequenos em relação aos monócitos, com uma baixa razão núcleo/citoplasma, de acordo com o esperado (Figura 15D). Como observado em monócitos, linfócitos também apresentaram maior tamanho, com tendência a diminuição da razão núcleo/citoplasma, além de maior frequência de citoplasma com

coloração irregular (Figura 15E-F). Plasmócitos foram observados com pouca frequência, porém mais evidentes nas aves com alta parasitemia (Figura 15G).

Eosinófilos foram raramente observados, mas nenhuma mudança aparente entre as aves não infectadas (Figura 16A) e infectadas (Figura 16B) foi observada. A análise de heterófilos de aves não infectadas (Figura 16C) e infectadas com parasitemia moderada (Figura 16D) também mostrou morfologia semelhante. No entanto, aves com alta parasitemia além de heterófilos com aspecto normal apresentaram heterófilos com pigmentos tóxicos (Figura 16E), normais (Figura 16C, D) e heterófilos tóxicos lobulados (Figura 16F). Nenhuma diferença clara na mudança de morfologia ao longo da infecção foi encontrada entre aves tratadas e não tratadas com AG.

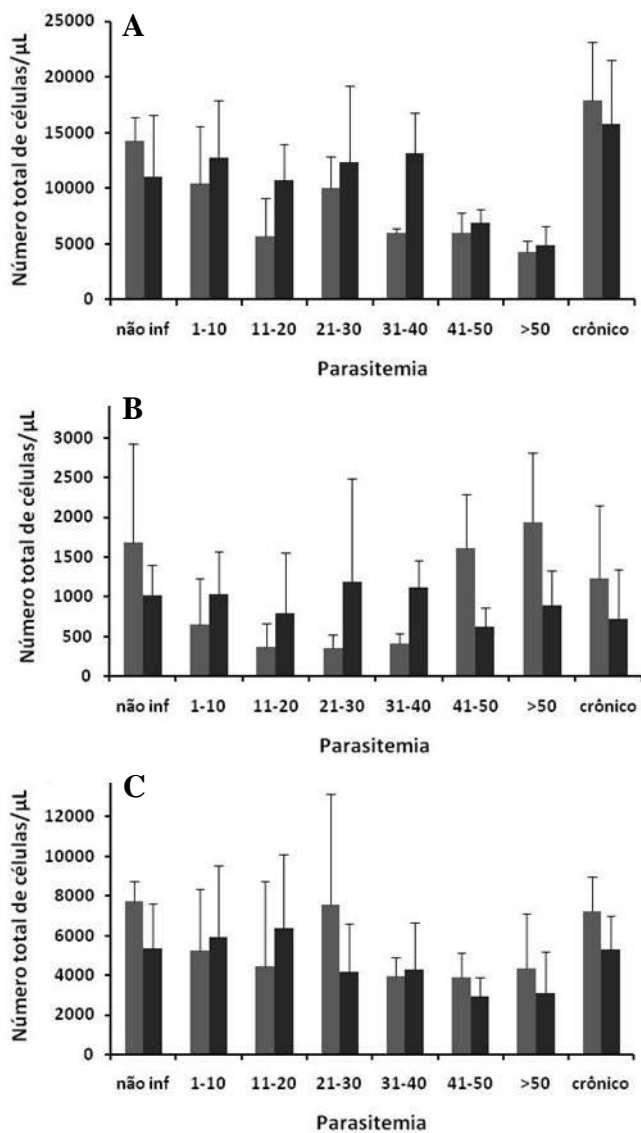


Figura 14. Número absoluto de linfócitos (A), monócitos (B) e heterófilos (C) de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* tratadas (barras escuras) ou não (barras claras) com aminoguanidina.

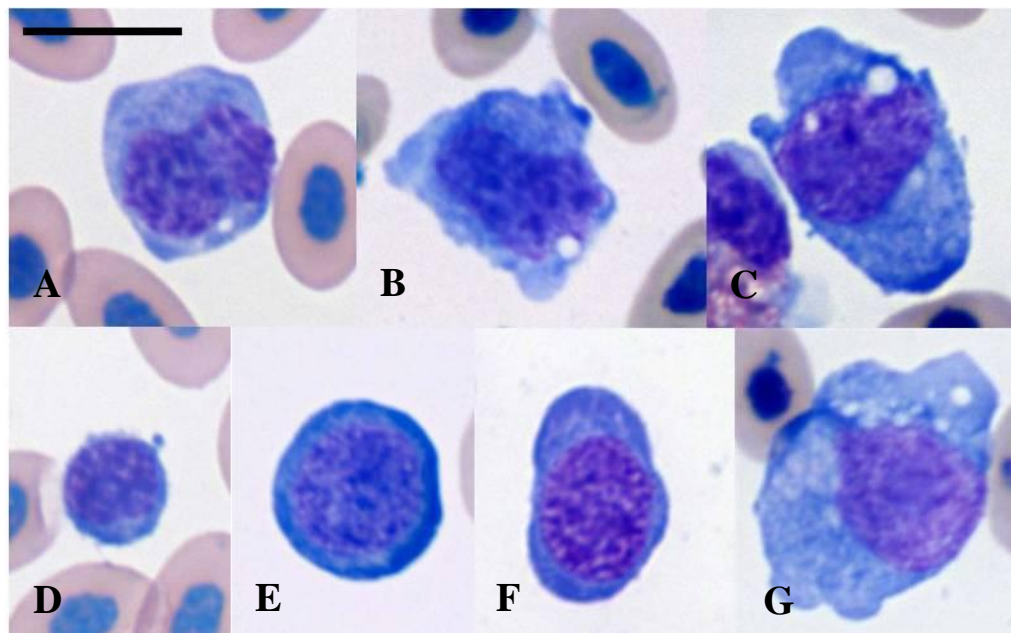


Figura 15. Monócitos, linfócitos e plasmócitos de galinhas infectadas ou não com *Plasmodium gallinaceum*. A-C, monócitos de animais não-infectados e infectados com baixa e alta parasitemia, respectivamente. D-F, linfócitos de animais não-infectados e infectados com baixa e alta parasitemia, respectivamente. Nota: monócitos e linfócitos maiores devido a alta parasitemia. G, plasmócitos foram observados em animais infectados. Barra = 10 μm .

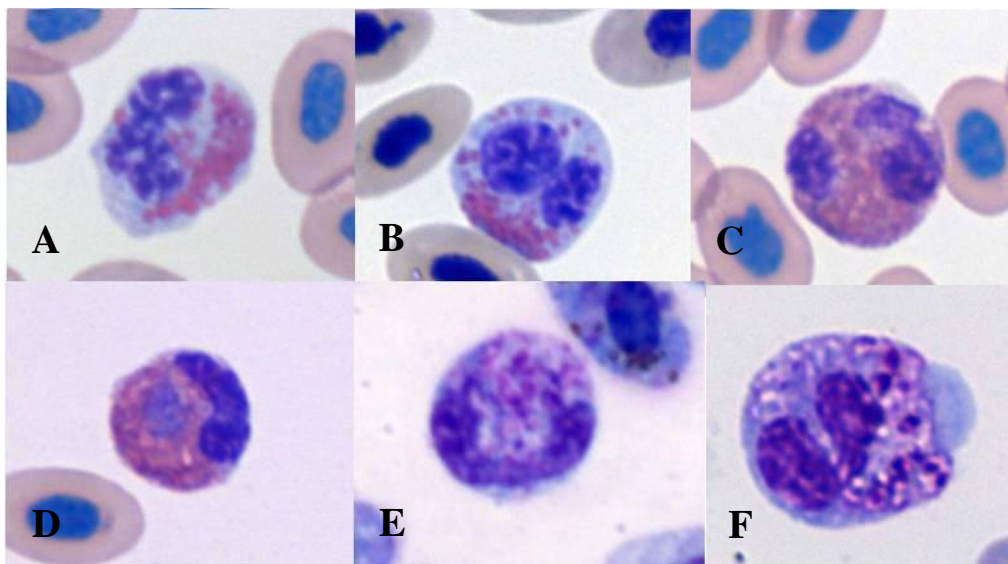


Figura 16. Eosinófilos e heterófilos de galinhas infectadas ou não com *Plasmodium gallinaceum*. A-B, eosinófilos de animais não infectados e infectados com baixa parasitemia, respectivamente, sem aparentes mudanças morfológicas com a infecção. Heterófilos normais em animais não infectados (C) e com baixa parasitemia (D); com alta parasitemia, heterófilos bastão (E) e tóxicos (F). Barra = 10 μ m.

Trombócitos também apresentaram alterações morfológicas durante a infecção em animais com alta parasitemia (Figura 17). Trombócitos sanguíneos apareceram em maior tamanho devido aumento da região citoplasmática, com presença de vários vacúolos (Figura 17A-C).

Após isolamento do sangue e cultivo por 1h, trombócitos apresentaram núcleo espalhado com cromatina corada de forma intensa, assim como citoplasma com mais vacúolos evidentes (Figura 17D). Poucos (<4%) apresentaram núcleo picnótico com citoplasma retraído (Figura 17E), o que indica apoptose como anteriormente relatado (DaMatta *et al.*, 1999). Entretanto, aves infectadas apresentaram trombócitos atípicos com citoplasma espalhado, porém com núcleo alongado (Figura 17F) ou com dois núcleos (Figura 17G). Esses trombócitos atípicos foram confirmados como trombócitos após técnica de imunofluorescência (Figura 18). Células com morfologia típica de trombócitos, mas com núcleo alongado ou dois núcleos (Figura 18A-B) foram reconhecidas pelo anticorpo monoclonal 11C3 específico para trombócitos de galinha (Lacoste-Eleaume *et al.*, 1994). Trombócitos normais e picnóticos também foram positivos para este anticorpo após 24h em cultura, mas a marcação de macrófagos foi negativa (Figura 18C-D). Extensões sanguíneas também revelaram trombócitos com dois núcleos, mas esse tipo morfológico foi raro (Figura 18E-G).

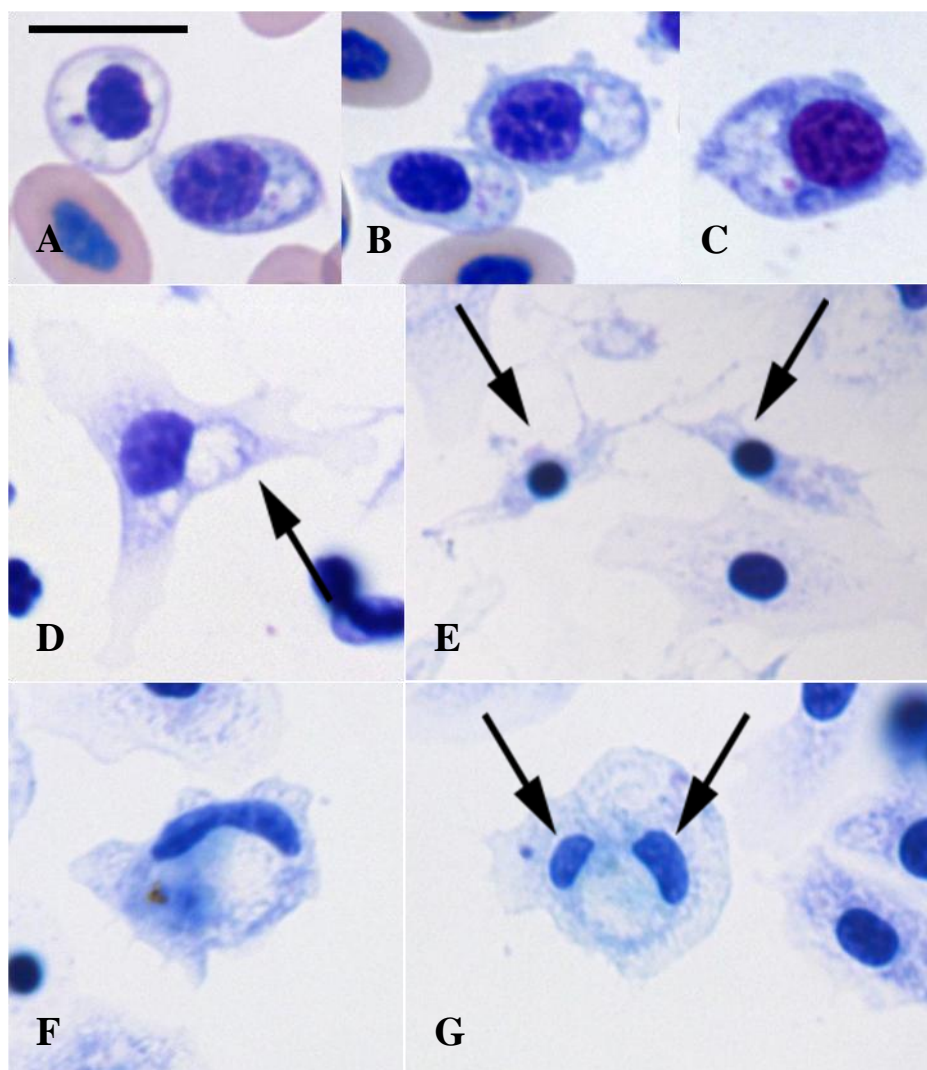


Figura 17. Trombócitos de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* em extensões sanguíneas corados com Giemsa (A, B, C) e após cultura por 1h (D, E, F, G). Trombócitos maiores e com mais vacúolos em animais com alta parasitemia (A-C). (D) trombócitos normais com típicos vacúolos (seta). (E) Trombócitos picnóticos, com cromatina condensada (setas). Trombócitos atípicos com mononúcleo longo (F) e dois núcleos (setas) (G). Barra = 10 μ m

Trombócitos normais, picnóticos, com núcleo alongado ou dois núcleos foram marcados em aves não infectadas e infectadas, tratadas e não tratadas com AG e classificados de acordo com os intervalos de parasitemia durante a infecção (Figuras 19, 20 e 21). Após 1h de cultura, aves não infectadas e não tratadas com AG apresentaram menos trombócitos picnóticos quando comparadas com aves tratadas (Figura 19A, C). No entanto, após 24h de cultura não houve diferença no número de trombócitos picnóticos entre aves não infectadas, tratadas ou não com AG (Figura 19B, D). Todos os trombócitos atípicos apareceram em galinhas infectadas com *P. gallinaceum*, mas, não foi observada nenhuma correlação clara entre o número de trombócitos atípicos e a parasitemia (Figuras 20 e 21). Entretanto, a adição das duas categorias de trombócitos atípicos (núcleo alongado e dois núcleos), após 1 h de cultivo, obtidos de animais com parasitemia baixa e alta ou aves tratadas ou não com AG, mostraram que parasitemia elevada e tratamento com AG induziram aumento de duas vezes no número desses trombócitos atípicos quando comparado com a soma dos trombócitos normal e picnóticos dos outros grupos de aves (Figuras 20A, C e 21A, C).

Resultado interessante foi após 24h de cultura, onde o número de trombócitos picnóticos diminuiu drasticamente com a infecção e um aumento significativo foi detectado dos trombócitos com dois núcleos; no entanto, não foi encontrada correlação entre as aves com parasitemia baixa ou alta, ou mesmo no tratamento com AG (Figura 20B, D e 21B, D). Além disso, não houve diferenças nos tipos de trombócitos após 24h de cultura entre aves tratadas ou não tratadas com AG após a infecção (Figura 20B, D e 21B, D). Como esperado, as aves com maior parasitemia apresentaram trombócitos mais infectados sem aparente preferência entre os tipos de trombócitos (não mostrado).

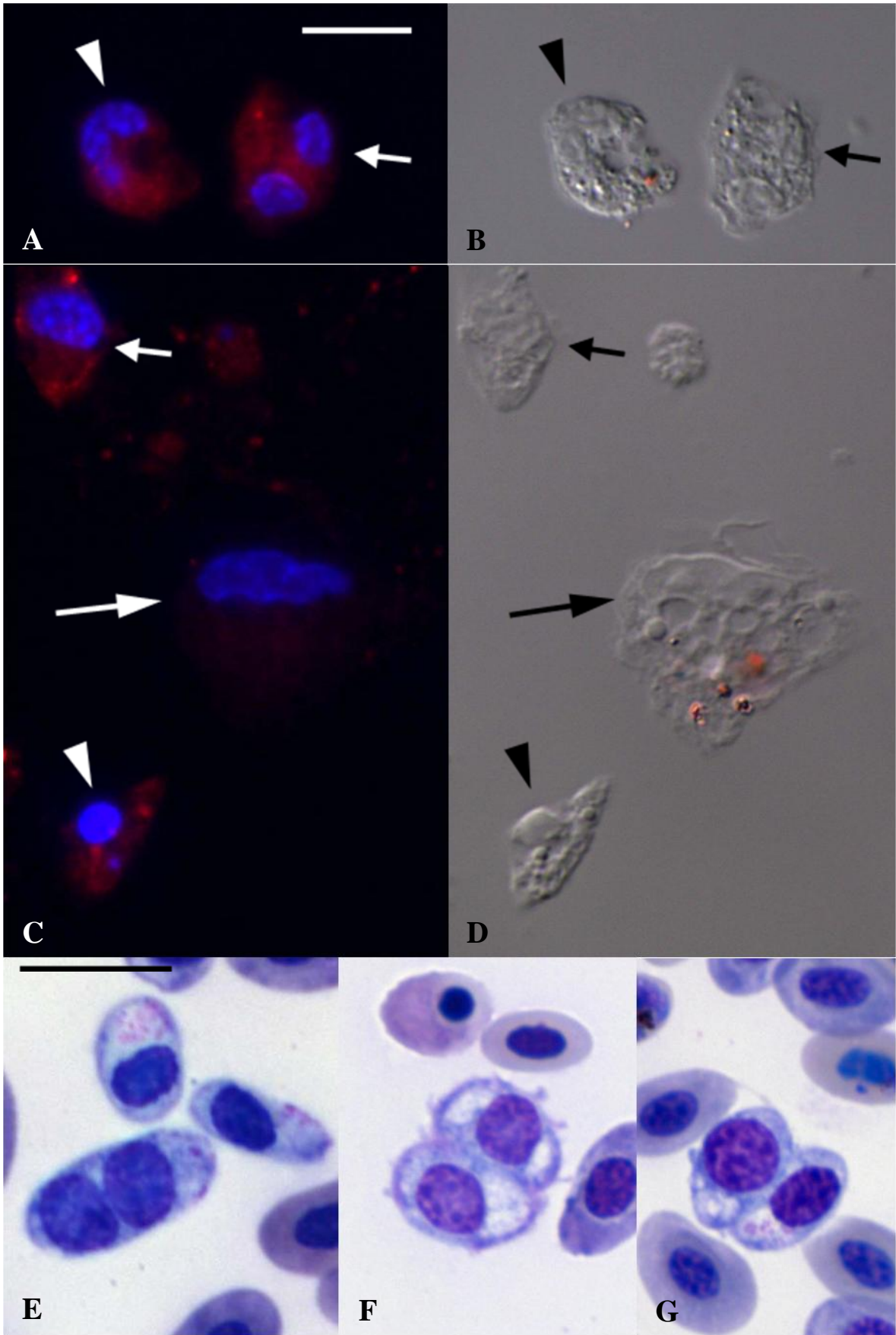


Figura 18. Trombócitos atípicos positivos para anticorpo anti-trombócito 11C3 e raramente encontrados em extensões sanguíneas coradas. Microscopia de fluorescência (A, C) e contraste diferencial (B, D) após marcação das células com anticorpo anti-trombócito 11C3; células cultivadas por 1h (A, B) e 24 h (C, D). Microscopia de campo claro de extensões sanguíneas coradas (E, F, G). (A, B). Trombócitos atípicos com um núcleo (cabeça de seta) ou dois (seta) cultivados por 1h e positivos para 11C3. (C, D). Trombócitos normais (seta) e picnóticos (cabeça de seta) positivos para 11C3; macrófago (seta longa) foi negativo para 11C3. (E, F, G) Trombócitos atípicos com dois núcleos observados em extensões sanguíneas de galinhas com alta parasitemia. Barra = 10 μ m, barra em A e E é a mesma em B, C, D e F, G, respectivamente.

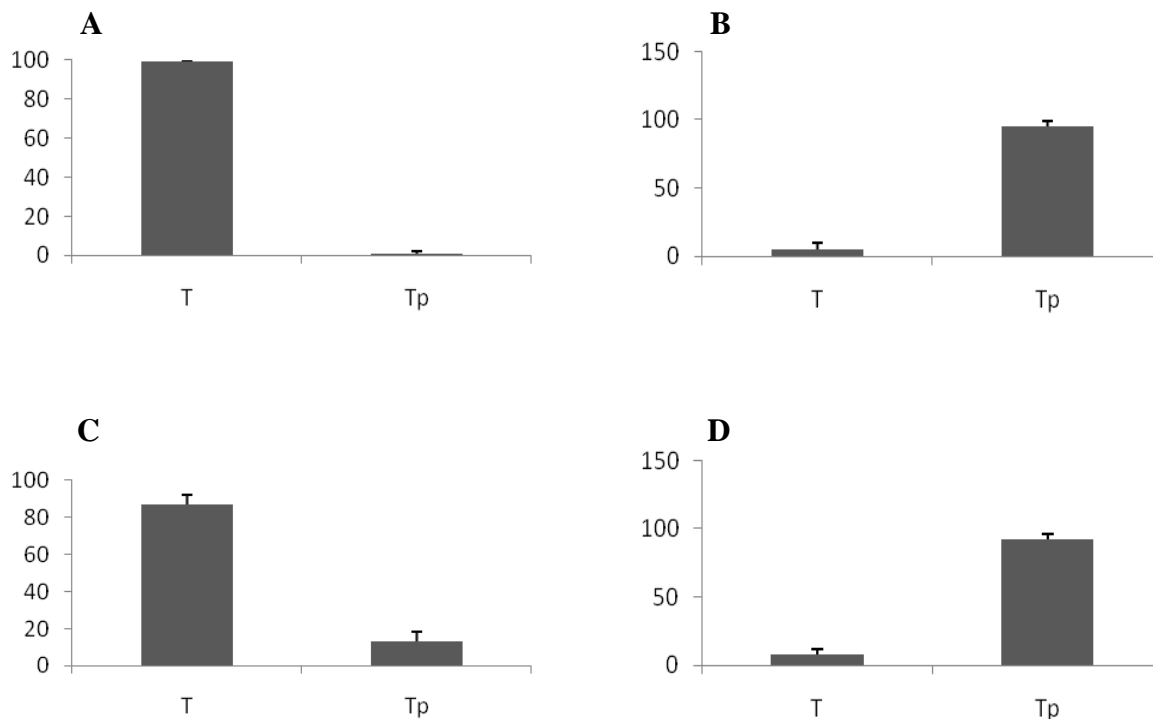


Figura19. Contagem diferencial de tipos de trombócitos, obtidos em cultura, de galinhas não infectadas com *Plasmodium gallinaceum*, tratadas ou não com aminoguanidina. Trombócitos foram definidos como normal (T) e picnótico (Tp) (ver figura 18). A e B, trombócitos de galinhas não tratadas com AG, 1h e 24h de cultura, respectivamente; C e D, trombócitos de galinhas tratadas com AG, 1h e 24h de cultura, respectivamente. Nota: trombócitos de galinhas não infectadas tratadas com aminoguanidina possuem menos trombócitos picnóticos após 1h de cultura (A, C).

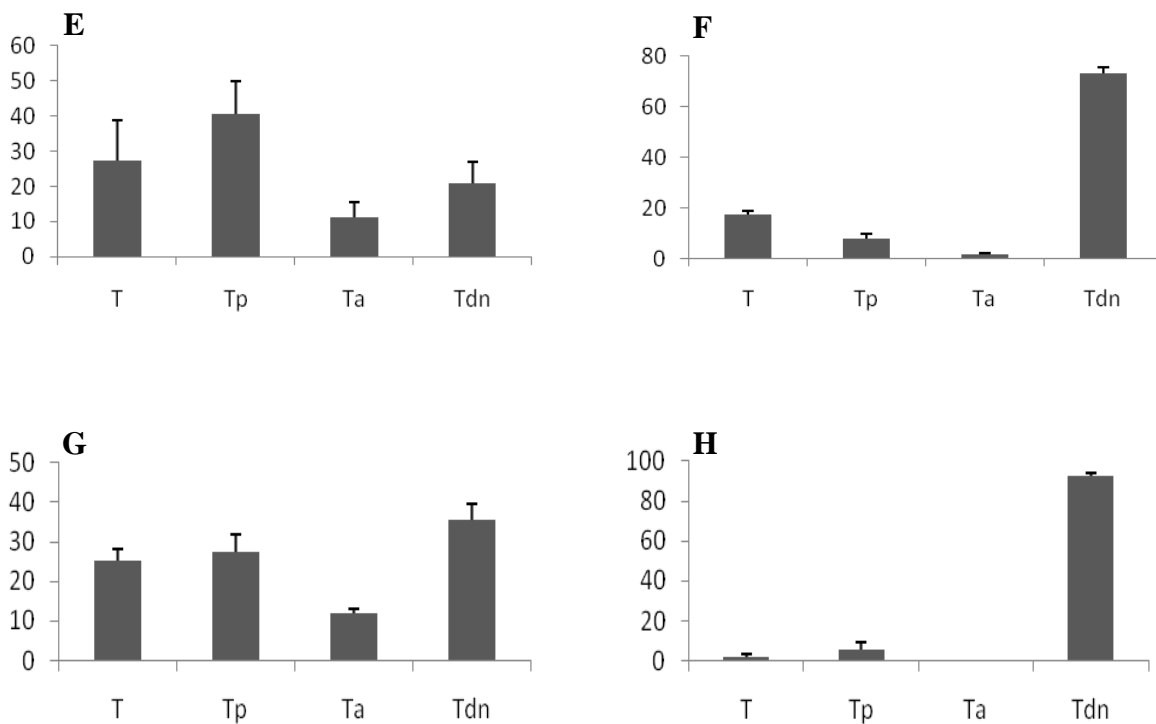


Figura 20. Contagem diferencial de tipos de trombócitos, obtidos em cultura, de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum*, em baixa parasitemia (15%), tratadas ou não com aminoguanidina. Trombócitos foram definidos como normal (T), picnótico (Tp), núcleo alongado (Ta) ou dois núcleos (Tdn) (ver figura 18). A e B, trombócitos de galinhas não tratadas com AG, 1h e 24h de cultura, respectivamente; C e D, trombócitos de galinhas tratadas com AG, 1h e 24h de cultura, respectivamente. Nota: após infecção, as galinhas apresentaram trombócitos atípicos, com núcleo alongado (Ta) ou dois núcleos (Tdn).

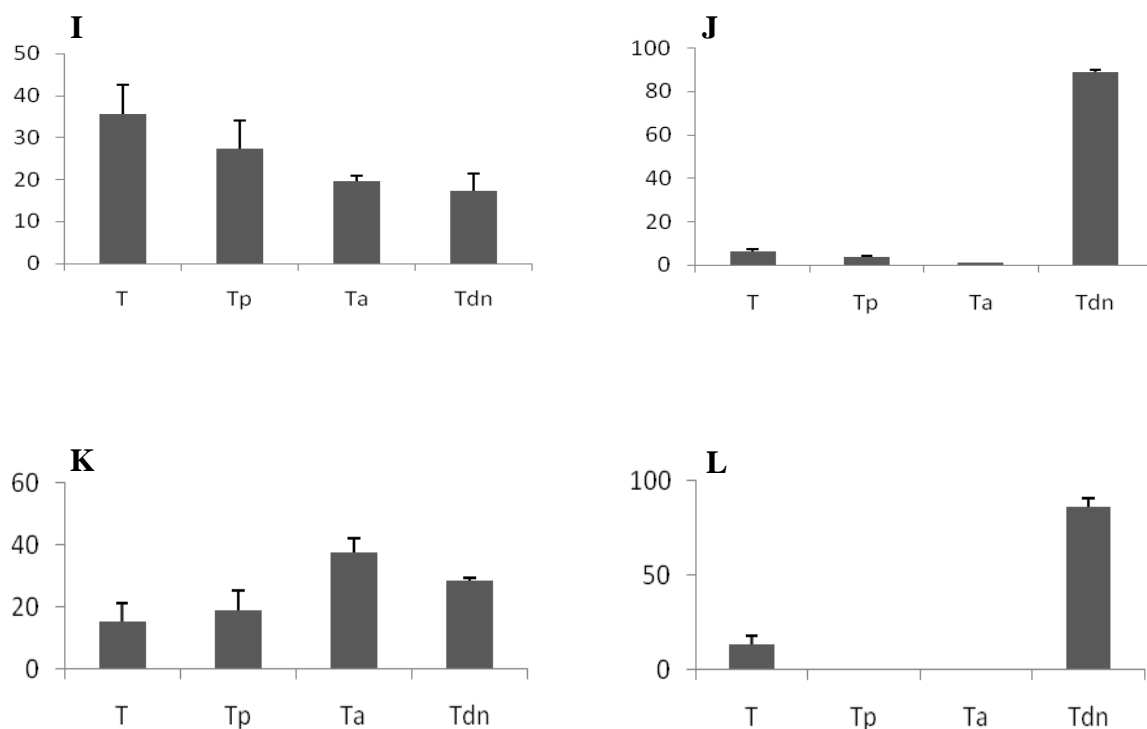


Figura 21. Contagem diferencial de tipos de trombócitos, obtidos em cultura, de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum*, em alta parasitemia (51%), tratadas ou não com aminoguanidina. Trombócitos foram definidos como normal (T), picnotico (Tp), núcleo alongado (Ta) ou dois núcleos (Tdn) (ver figura 18). A e B, trombócitos de galinhas não tratadas com AG, 1h e 24h de cultura, respectivamente; C e D, trombócitos de galinhas tratadas com AG, 1h e 24h de cultura, respectivamente. Nota: não foi observada diferença no número de trombócitos atípicos nas galinhas infectadas, tratadas ou não com aminoguanidina, após 1h de cultura (baixa e alta parasitemia), a exceção foi em animais tratados e com alta parasitemia que mostraram maior número de trombócitos atípicos (C); após 24h em cultura, galinhas infectadas, independente de tratamento, mostraram maior número de trombócitos com dois núcleos (Figuras 20B, D e 21B, D).

A bioquímica sérica de algumas enzimas e substâncias também foi analisada durante o período de infecção entre aves tratadas e não tratadas com AG (Figura 22). ALT e AST mostraram uma tendência a aumentar com a maior parasitemia sem diferença clara entre os dois grupos (Figura 22A e B). Redução da FAL foi detectada com o aumento da parasitemia, mas novamente nenhuma diferença entre os dois grupos foi detectada (Figura 22C). Por outro lado, os valores para uréia e ácido úrico mostraram-se elevados com o aumento da parasitemia somente para o grupo de aves não tratadas (Figura 22F e G). Nenhuma alteração aparente foi detectada para LDH, colesterol e creatinina entre os dois grupos de aves com o aumento da parasitemia (Figura 22C, E, H).

A medição de nitrito no plasma mostra valores basais desse metabólito do NO em aves normais e após infecção antes do aparecimento de parasitos no sangue. No entanto, com a evolução da parasitemia se observa aumento nos níveis de nitrito, que alcança níveis duas vezes maior em relação aos animais não parasitados (Figura 23). Por outro lado, este intenso aumento não é verificado nos animais tratados com AG, mesmo em alta parasitemia (Figura 23). Nos animais com infecção crônica, os níveis de nitrito se mostraram semelhantes aos níveis basais encontrados nos animais não parasitados.

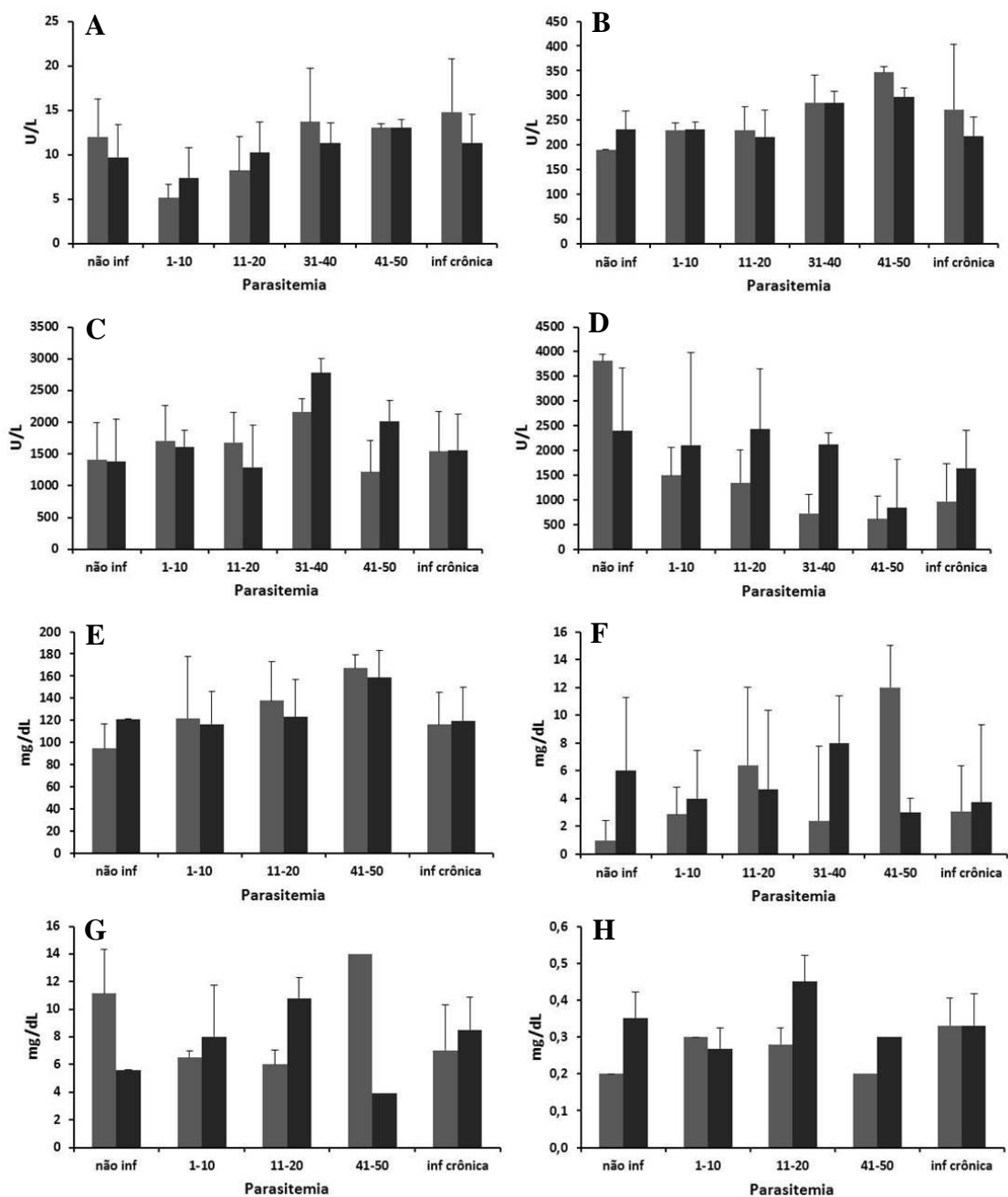


Figura 22. Bioquímica sérica de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* tratadas (barras pretas) ou não (barras cinzas) com aminoguanidina, agrupadas em intervalos de parasitemia. (A) ALT, (B) AST, (C) LDH, (D) FAL, (E) Colesterol, (F) Uréia, (G) ácido úrico, (H) Creatinina. Nota: pequenas mudanças em ALT, AST, FAL, porém sem diferenças entre os grupos com aumento da parasitemia; uréia e ácido úrico aumentaram somente no grupo não tratado.

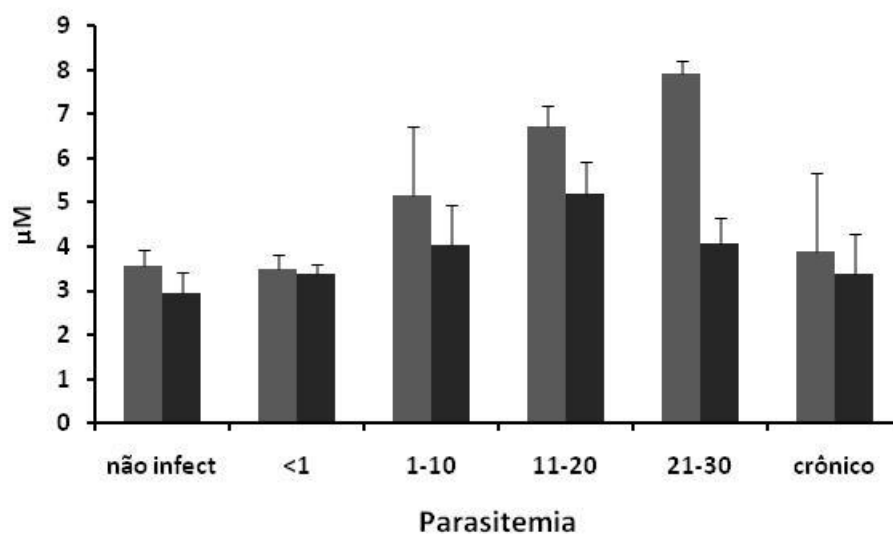


Figura 23. Níveis de nitrito no plasma de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* tratadas (barras escuras) ou não (barras claras) com aminoguanidina, agrupadas por intervalos de parasitemia.

A histopatologia do baço de aves com alta parasitemia na fase aguda da infecção mostrou elevada depressão de linfócitos, nas aves tratadas com AG, e moderada, nas aves não tratadas (Figura 24A, C). Aves tratadas também apresentaram menos pigmento malárico no baço (Figura 24B, D). Em aves com infecção crônica, nenhuma diferença clara foi encontrada entre os grupos, tratado e não tratado. Uma pequena depressão de linfócitos foi detectada nesses animais, com pequenos linfócitos foliculares (Figura 24E-F), indicando reestruturação do órgão nesta fase da infecção.

Nos achados histopatológicos do fígado de aves tratadas com AG com alta parasitemia na fase aguda da infecção foi visto um rico infiltrado inflamatório, composto por células mononucleares e raros heterófilos, com localização perivascular (Figura 25A). Também foi observado necrose devido à coagulação (não mostrado). Aves tratadas com AG apresentaram menor infiltrado inflamatório (Figura 25B) com menos pigmento malárico (Figura 25D). As aves com infecção crônica, não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratado e não tratado. Ainda no fígado das aves com infecção crônica foi observada degeneração hidrópica difusa, porém sem infiltrado inflamatório e/ou áreas de necrose (Figura 25E-F).

Em relação ao cérebro, os achados histopatológicos em galinhas com alta parasitemia na fase aguda da infecção mostraram características patológicas semelhantes entre os grupos tratado e não tratado com AG. Estase vascular com concentração de leucócitos foi observada em aves de ambos os grupos; foi encontrado pigmento malárico em células da vasculatura (Figura 26A, B). No entanto, algumas secções do cérebro apresentaram pigmento malárico no tecido, fora dos vasos (Figura 26C, D). Não foram encontradas diferenças entre os grupos tratados e não tratados com AG na fase crônica da infecção. No entanto, esses animais apresentaram gliose “cicatricial” (Figura 26E) que foi negativa para pigmento malárico (Figura 26F).

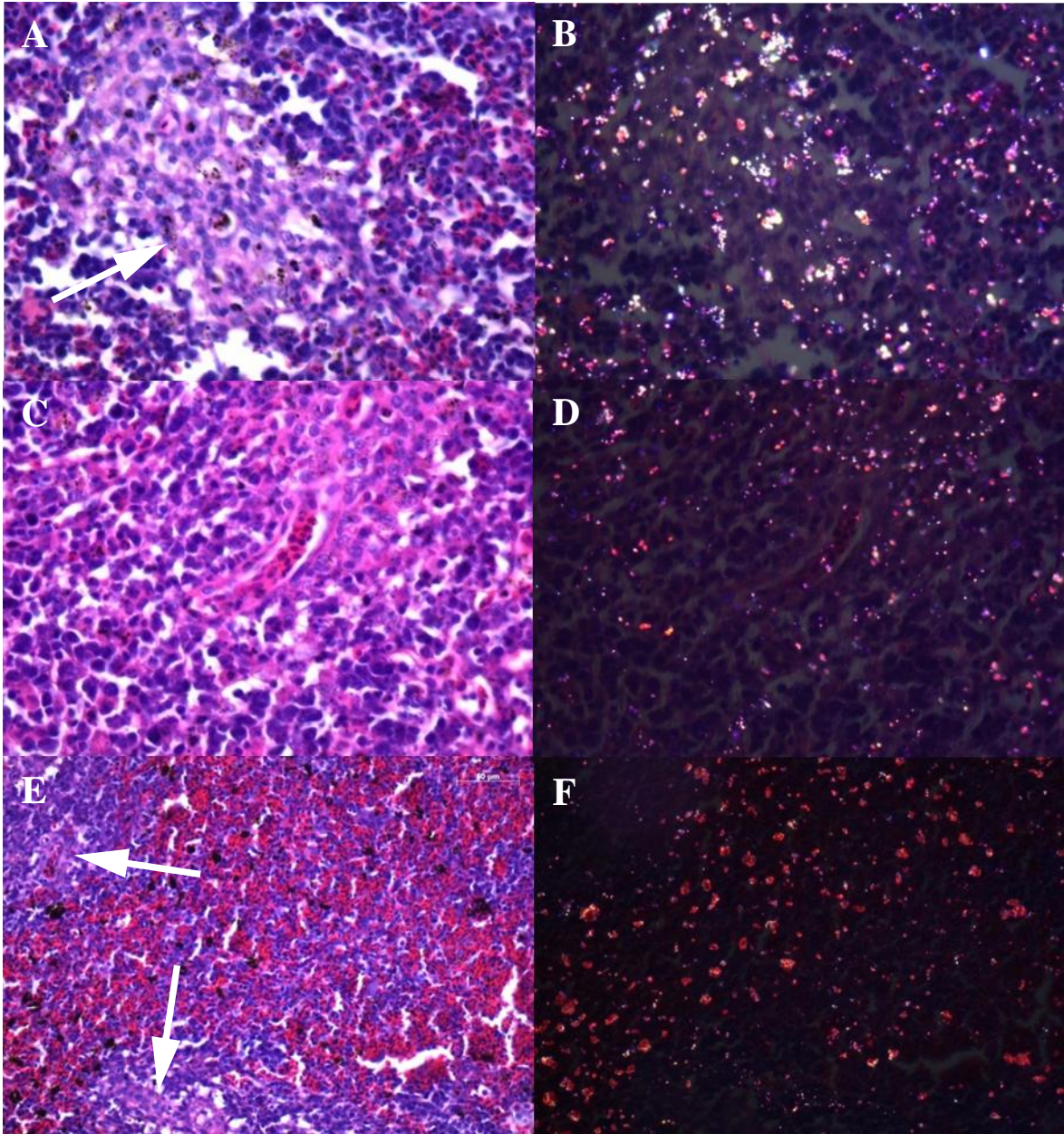


Figura 24. Baço de galinhas tratadas com aminoguanidina tem maior depressão de linfócitos e menos pigmento da malária durante a fase aguda da infecção. A. Secções de baço coradas com H&E de galinhas não tratadas no período de infecção aguda mostrando depressão de linfócitos (setas). B. Mesmo campo visual observado por microscopia polarizada. C. Secção de baço corada com H&E de galinhas tratadas com aminoguanidina no período de infecção aguda mostrando extensa depressão de linfócitos. D. Mesmo campo visual observado por microscopia polarizada. Nota: menos material birrefringente em secções de tecidos de galinhas tratadas. E. Secções de baço coradas com H&E de galinhas com infecção crônica não tratadas mostrando pequenos folículos linfóides (setas). F. Mesmo campo visual observado por microscopia polarizada. Barra = 50 μm .

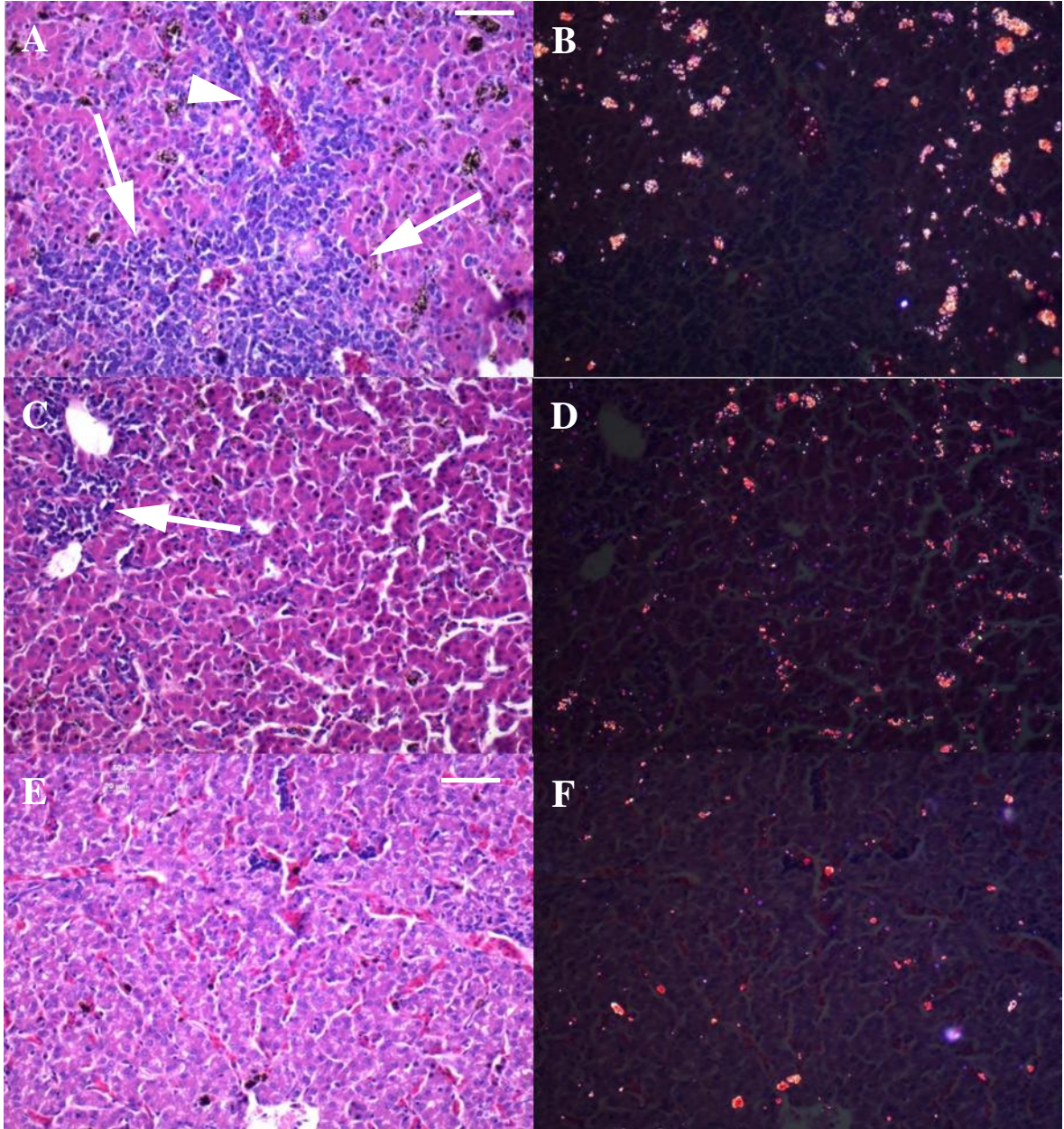


Figura 25. Fígado de galinhas tratadas com aminoguanidina possui menos pigmento malárico durante a fase aguda da infecção. A. Secções de fígado coradas com H&E de galinhas tratadas durante período de infecção aguda. Extensa área de infiltrado inflamatório (setas), ao lado de um vaso (cabeça de seta). B. Mesmo campo visual observado por microscopia polarizada. C. Secção de fígado corada com H&E de galinhas tratadas com aminoguanidina no período de infecção aguda. Infiltrado inflamatório pode ser observado (seta). D. Mesmo campo visual observado por microscopia polarizada. Nota: menos birrefringência em secções de tecido de galinhas tratadas com aminoguanidina. E. Secção de fígado corada com H&E de galinhas não tratadas com infecção crônica mostrando degeneração hidrópica difusa. F. Mesmo campo visual observado por microscopia polarizada. Nota menos material birrefringente em animais com infecção crônica. Barra = 50 μm .

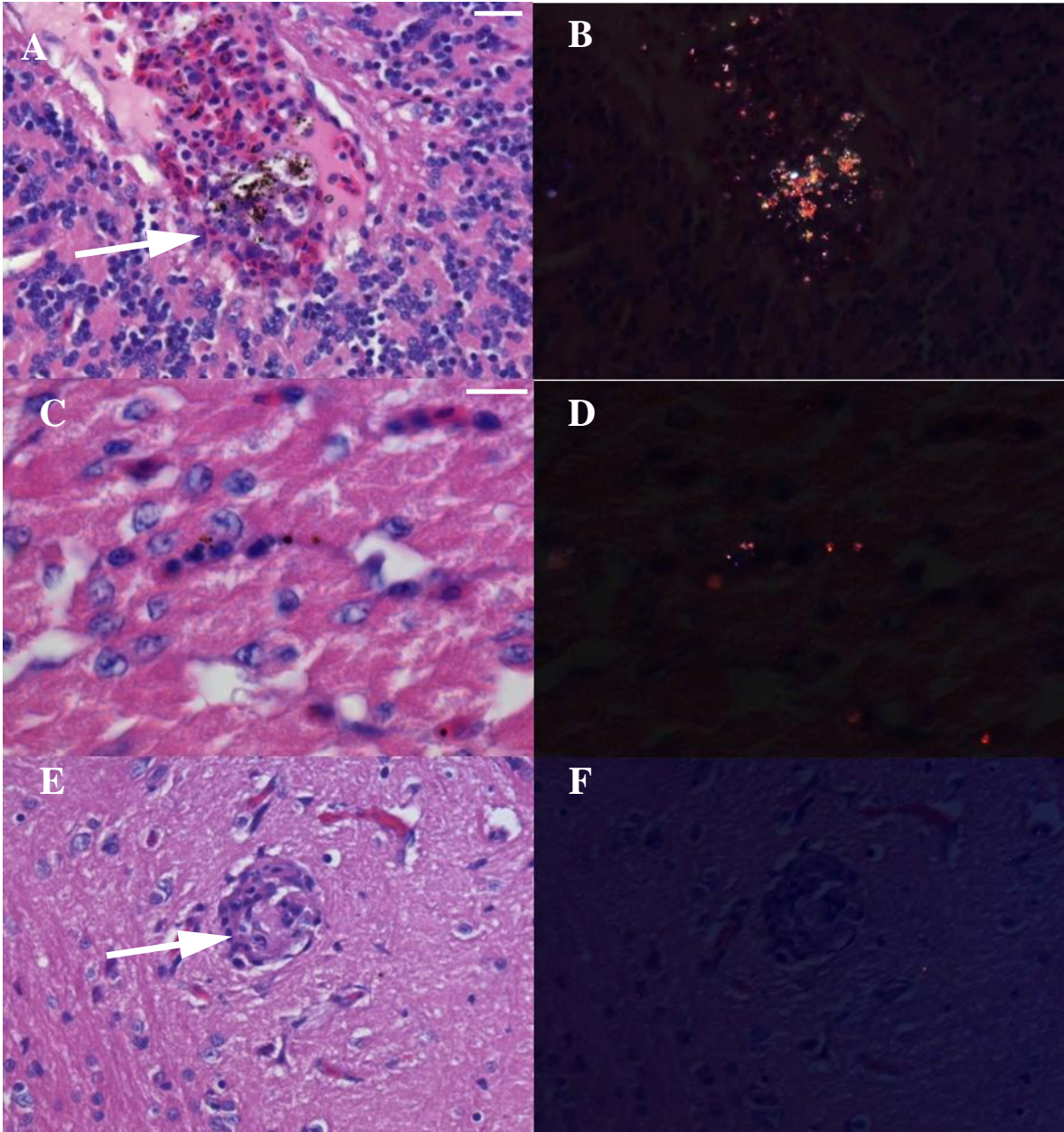


Figura 26. Secções de cérebro de galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* tratadas ou não com aminoguanidina. Nenhuma diferença na patologia foi encontrada entre galinhas tratadas e não tratadas com aminoguanidina. A. Secção de cérebro abaixo da região granular de uma galinha na fase aguda da infecção, corada com H&E. Nota: estase vascular com concentração de leucócitos dentro do vaso (seta). B. Mesmo campo visual observado por microscopia polarizada. Nota: pigmento malárico dentro do vaso. C. Secções de cérebro de galinhas na fase aguda da infecção apresentaram pigmento malárico fora do lumen vascular. D. Mesmo campo visual observado por microscopia polarizada. Nota: pigmento malárico no tecido. E. Secção de cérebro abaixo da região granular de galinha na fase crônica da infecção, corada com H&E. Nota: gliose cicatricial (seta)no tecido nervoso. F. Mesmo campo visual observado por microscopia polarizada. Barra = 50 μm for A, B, E, F and 10 μm for C, D.

5. DISCUSSÃO

Apesar de vários estudos e descobertas, muitos aspectos envolvidos na patologia da malária ainda precisam ser elucidados, sendo a doença uma das principais causas de mortalidade no mundo (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Diante disso, a importância de modelos experimentais torna-se evidente, pois são capazes de reproduzir aspectos comuns a malária humana (Langhorne, 1994; De Souza & Riley, 2002; 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 novas drogas terapêuticas (Garnham, 1966; Krettli *et al.*, 2001; Permin & Juhl, 2002; Williams, 2005; Macchi *et al.*, 2010). 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 evolução da infecção experimental de galinhas por *P. gallinaceum* após tratamento *in vivo* com AG, inibidor da produção de NO.

Trabalhos anteriores (Permin & Juhl, 2002; Williams, 2005; Macchi *et al.*, 2010) 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 de macrófagos. No estudo atual foi demonstrado algumas características clínicas, hematológicas, bioquímicas e histopatológicas envolvidas na patogênese da doença, além da correlação direta com os níveis de parasitemia. Dentre as características clínicas mais frequentes encontramos falta de apetite (anorexia), anemia (evidenciada pelos valores hematológicos e cor das pernas e cristas) e febre, como já descrito por Williams (2005) e Macchi *et al.* (2010). Em alguns

animais foram observados sintomas relacionados a distúrbios neurológicos como nistagmo e contração muscular involuntária da face, além disso, um animal do grupo não tratado com AG apresentou vocalização anormal, recolhimento do corpo com o bico voltado para baixo confirmando a ação do parasito no tecido cerebral, como já demonstrado por Paraense (1946) e Macchi *et al.* (2010).

O presente estudo mostrou que a intensidade das características clínicas encontradas pode ser correlacionada com o aumento da parasitemia. No entanto, esse achado se aplica mais ao grupo não tratado com AG, uma vez que o grupo tratado mostrou características clínicas de menor intensidade, porém com maiores níveis de parasitemia. As manifestações clínicas mais brandas no grupo tratado com AG, bem como a maior taxa de sobrevivência em relação ao grupo não tratado, nos permite inferir a importância da produção do NO na patogênese da doença, evidenciando sua ação microbicida, constatada com a alta parasitemia do grupo tratado com inibidor de NOS, como também relatado por Taylor-Robinson & Smith (1999). Nossos resultados sugeriram o 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; Maneerat *et al.*, 2004) e observação de cérebros *post mortem* de malária fatal por *P. falciparum* (Maneerat *et al.*, 2004), indicando similaridade entre os modelos estudados com diferentes hospedeiros e espécies de *Plasmodium*.

O período de desenvolvimento da doença, com aparecimento das manifestações clínicas, agravamento do quadro e morte foi similar ao descrito em trabalhos anteriores (Permin & Juhl, 2002; Williams, 2005), com pico de morte entre os dias 9-11 pi. Macchi *et al.* (2010) demonstraram um índice de mortalidade >90% em animais livres de tratamento com AG, com picos de morte entre os dias 7-9 pi. Essa diferença pode ser

atribuída a diferentes linhagens de galinhas utilizadas nos estudos ou mesmo a idade das aves, que no presente estudo possuíam 35 dias de idade, enquanto Macchi *et al.* (2010) utilizaram aves jovens com 10 dias de idade. Para uma melhor análise dos picos parasitêmicos, os animais com infecção crônica foram separados dos animais que morreram, nos grupos tratado e não tratado com AG. O presente estudo mostrou alta mortalidade (cerca de 66%) de animais infectados com *P. gallinaceum*, não tratados com AG, sem observação de resposta satisfatória no sistema imune das aves (Paraense, 1946; Ferris *et al.*, 1973; Soulsby, 1982; Springer, 1996; Williams, 2005; Frevert *et al.*, 2008; Macchi *et al.*, 2010). Por outro lado, os animais tratados diariamente com AG tiveram um índice de mortalidade mais baixo em relação aos não tratados (cerca de 30%), apesar do sistema imunológico suprimido pela ação da AG, evidenciando fortemente o envolvimento do NO no processo de patogênese da doença (Ghigo *et al.*, 1995; Macchi *et al.*, 2010). Em ambos os grupos, tratado e não tratado com AG, foi observada uma heterogeneidade em relação ao desenvolvimento da parasitemia, como já demonstrado anteriormente (Macchi *et al.*, 2010). Isso pode ser explicado por diversos fatores, sendo um deles a resposta imunológica individual.

Trabalhos anteriores sugeriram que galinhas infectadas com *P. gallinaceum* morrem por anemia devido a lise de hemácias (Wright and Kreier, 1969) e malária cerebral, devido a formas exo-eritrocíticas nas células endoteliais bloqueando os capilares cerebrais (Paraense, 1946; Greenberg *et al.*, 1950). Estudos anteriores também correlacionam anemia com deficiência de IL-10 em resposta a altas concentrações de TNF- α (Heddini, 2002), mas a anemia é o resultado da destruição de hemácias durante o ciclo eritrocítico do *P. gallinaceum*. Nesse contexto, as alterações hematológicas foram avaliadas com intuito de verificar se a causa da morte mostrava relação direta com o aumento da parasitemia e lise das hemácias. De fato, o aumento da parasitemia, diminui o

número total de hemácias e valores de hematócrito e hemoglobina, provavelmente devido a hemólise provocada pelo próprio parasito (Soni & Cox, 1975a,b; Williams, 2005; Macchi *et al.*, 2010). No entanto, essa anemia parece não ser a principal causa de mortalidade, visto que o grupo tratado com AG apresentou maiores valores de parasitemia, com valores hematológicos da série vermelha próximos aos observados no grupo não tratado, mas mais próximos dos animais controles. Esse fato sugere outro mecanismo para a morte, o que explicaria a melhor sobrevida à infecção, apesar da maior parasitemia apresentada.

Ao analisar os índices hematimétricos, verificamos pequeno aumento do VCM em animais infectados, tratados ou não com AG, em relação aos animais não infectados, indicando a presença de hemácia jovem (hemácia grande) que pode ter sido lançada na circulação como resposta do organismo em suprimento a hemólise causada pelo parasito (Lopes *et al.*, 2007). Em relação ao CHCM, diminuído nos animais infectados em parasitemias moderadas e altas, indicando diminuição da síntese de hemoglobina. No entanto, essa afirmação não pode ser feita, pois como o VCM indica aumento de hemácias imaturas, os níveis de hemoglobina podem estar apenas fisiologicamente alterados, embora a análise dos níveis de hemoglobina tenha mostrado diminuição nos animais infectados, tratados ou não com AG (Lopes *et al.*, 2007).

Keller *et al.* (2004) descreveram a anemia com patogênese multifatorial e não unicamente pelo parasito, principalmente devido a destruição de eritrócitos não parasitados pelo sistema imune e alterações na membrana da célula parasitada, o que provoca congestão de vasos. Nossos resultados demonstram correlação positiva entre os valores hematológicos da série vermelha e a parasitemia, fato observado com o aumento nos valores de hematócrito e hemoglobina e regressão da parasitemia nos animais com infecção crônica, em ambos os grupos, tratado e não tratado. Esses resultados estão de acordo com Permin & Juhl (2002) que observaram uma diminuição no número de

hemácias sadias e aumento no número de hemácias parasitadas (células/ μ l de sangue), fato atribuído à redução da eritropoiese por ação de citocinas, como TNF- α , produzido durante a infecção como resposta do sistema imune (Clark & Cowden, 2003; Jaramillo *et al.*, 2004).

Os valores referentes a hematimetria e hematócrito foram muito próximos entres os grupos tratado e não tratado com AG. No entanto com o desenvolvimento da parasitemia, tornaram-se distantes dos grupos não infectados, tratado e não tratado com AG. Esses dois grupos tiveram valores ligeiramente acima dos valores considerados por Mota *et al.* (1998) e os encontrados por Macchi *et al.* (2010), além dos valores referidos por Cardoso & Tessari (2003) para frangos de corte. Esta diferença pode ser atribuída às diferentes linhagens de aves utilizadas no experimento, ao tipo de ração fornecida ou mesmo à idade das aves experimentais.

As médias dos valores de hemoglobina não diferiram significativamente entre os dois grupos, tratado e não tratado com AG. No entanto, entre os grupos controles e infectados em diferentes parasitemias, esta diferença foi bem evidente, confirmando a destruição de hemácias com o aumento da parasitemia. Os valores normais estão próximos aos valores encontrados por Mota *et al.* (1998). Apesar de vários autores (Soni & Cox, 1975a,b; Permin & Juhl, 2002; Williams, 2005; Macchi *et al.*, 2010) relatarem anemia na fase aguda da infecção experimental por *P. gallinaceum*, não se tem na literatura estudos a cerca do perfil hematológico da série vermelha dessa infecção, o que dificulta o embasamento para maior discussão.

Os parasitos foram observados em hemácias maduras, imaturas e em divisão. Sabe-se que o *P. juxtannucleare* possui preferência em parasitar hemácias adultas (Bennet *et al.*, 1966; Krettli, 1971), mas em relação ao *P. gallinaceum* não existem estudos que evidenciem a predileção por hemácias. O que se sabe é o alto parasitismo provocado por

esse plasmódio (Permin & Juhl, 2002; Williams, 2005; Macchi *et al.*, 2010) que é diferente do *P. juxtannucleare*. O fato de serem encontradas hemácias em todos os estágios infectadas sugere que o *P. gallinaceum* não tem uma preferência por infectar hemácias maduras. Hemácias infectadas em divisão também sugere que a infecção está ocorrendo na medula óssea. Ademais, foi observado também aumento na quantidade de hemácias imaturas em extensões sanguíneas de aves com parasitemias elevadas, o que sugere maior produção de hemácias para suprir a destruição em massa provocada pelo parasito.

Além de parasitar hemácias, foram observadas formas de *P. gallinaceum* no citoplasma de trombócitos e alguns leucócitos. No entanto, não é possível afirmar com total clareza se houve parasitismo ou fagocitose por parte dessas células, sem um estudo mais aprofundado. Apesar de atividade fagocítica já ter sido mostrada em trombócitos, essas células não são os principais fagócitos na circulação sanguínea, e alguns parasitos, como *Toxoplasma gondii*, penetram ativamente nestas células (DaMatta *et al.*, 1998). Formas de trofozoítos e gametócitos foram observadas em trombócitos de galinhas naturalmente (Massard, 1982; Soares *et al.*, 1999) e experimentalmente (Silveira *et al.*, 2009) infectadas com *P. juxtannucleare* sem evidenciar relação com as características da cepa ou o grau de parasitismo do parasito. Dessa forma, a entrada e desenvolvimento do *P. gallinaceum* nestas células pode fornecer embasamentos suplementares que possam esclarecer a patogênese. A observação de formas de parasito em outros tipos celulares ocorreu em ambos os grupos, tratado ou não tratado com AG, sugerindo relação direta com índices de parasitemia.

O valor médio do número absoluto de trombócitos no sangue foi significativamente maior nos grupos não infectados e crônico, tratados ou não com AG em relação aos infectados. Esses valores revelaram correlação negativa com a crescente parasitemia das aves infectadas, não demonstrando de forma geral diferenças estatísticas

entre os grupos tratado e não tratado com AG. No entanto, analisando parasitemias elevadas (>50%) verificamos aumento significativo no número de trombócitos no grupo tratado em relação ao grupo não tratado, o que pode indicar o envolvimento dessas células na patogênese da doença e ainda uma possível interação com o NO, potencializando sua ativação. Esses dados podem ser confirmados com estudos mais detalhados. No entanto, os valores obtidos foram superiores aos encontrados por Mota (1997). Essa divergência pode estar relacionada ao emprego de diferentes técnicas para determinação desse parâmetro aliado a dificuldade em quantificar estas células que possuem ainda alta capacidade de aderência e formação de grumos (Lucas & Jamroz, 1961), principalmente em animais altamente parasitados.

Em relação a contagem total de leucócitos entre os animais infectados e não infectados, tratados ou não com AG, não foi registrada diferença significativa entre os grupos, apenas uma diminuição no número total de leucócitos em intervalos de parasitemia mais altas, mostrando uma diminuição da resposta imunológica nestes animais, levando em consideração esse índice. Este achado diverge de descritos na literatura onde o número de leucócitos se eleva na presença de organismos estranhos (Cardoso *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2009).

Na contagem diferencial observamos proporções celulares semelhantes a trabalhos anteriores (Lucas & Jamroz, 1961; Mota, 1997; Cardoso & Tessari, 2003). Quando comparamos os tipos celulares mais frequentes, notamos uma predominância de linfócitos, seguida em proporções inferiores por heterófilos e monócitos. O número absoluto de linfócitos diminuiu consideravelmente em animais infectados tratados com AG, a partir de 10% de parasitemia, o que em animais tratados com AG isso só foi observado em alta parasitemia (a partir de 40%). Nos animais com infecção crônica, o valor inicial foi estabelecido, com recuperação do número total de linfócitos. Em relação aos monócitos,

aves não tratadas mostraram valores inferiores as aves tratadas com AG, quando analisadas parasitemias baixa e moderada. No entanto, em altas parasitemias, essas aves apresentaram aumento no número total de monócitos, caracterizando uma monocitose, enquanto que as aves tratadas com AG mantiveram o mesmo valor médio. Os valores médios de heterófilos (conta-se bastonetes e segmentados) teve uma queda em parasitemias moderada e alta, em ambos os grupos, tratado e não tratado com AG. Essa variação na proporção de leucócitos pode indicar que a infecção malárica recruta essas células para o tecido infectado, e ainda que o NO pode influenciar esse recrutamento, uma vez que nos animais tratados com AG há uma tendência a maiores valores em relação ao grupo não tratado.

As hemácias parasitadas mostraram grânulos com birrefringência, que são característicos do gênero *Plasmodium* (Campbell, 2004). A caracterização morfológica de hemácias, trombócitos, linfócitos e monócitos foi semelhante a achados na literatura (Alberio *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2009; Bonadiman *et al.*, 2010). Monócitos e linfócitos tiveram tamanhos aumentados devido a alta parasitemia, além de serem encontrados com parasitos interiorizados. Em animais com alta parasitemia foram encontrados plasmócitos, evidenciando a participação de uma resposta humoral nesta infecção. Heterófilos com grânulos basofílicos foram encontrados em animais com alta parasitemia e classificados como tóxicos, semelhante a classificação feita por Campbell (2004) e demonstrada por Bonadiman *et al.* (2010). Eosinófilos diminuíram de número relativo com a infecção já que não foram mais vistos durante as contagens. Esses resultados caracterizam alterações morfológicas básicas desses leucócitos durante essa infecção. Indicam ativação, pelo aumento de tamanho de monócitos e linfócitos, e de heterófilos pelo aparecimento desse tipo celular classificado como tóxico. Ademais, indicam que eosinófilos não participam da resposta imunológica na infecção de *P. gallinaceum*.

Nos animais infectados, em alta parasitemia, tratados ou não com AG, também foram encontrados estágios mais tardios do parasito, o que foi evidenciado por microscopia polarizada mostrando a birrefringência do pigmento malárico, produzido pelo parasito após metabolização da hemoglobina (Moore *et al.*, 2002; Campbell, 2004).

Em cultivo e em maior proporção, os trombócitos mostraram características peculiares, nunca antes relatadas. Foram observados trombócitos com núcleo espalhado com cromatina corada de forma intensa, além de citoplasma com mais vacúolos evidentes, sugerindo uma modulação dessas células pela infecção. Foi observado, em cultivos de 24h, com maior proporção em altas parasitemias, trombócitos com núcleo picnótico e citoplasma retraído, evidência de apoptose como relatado em trabalho anterior (DaMatta *et al.*, 1999). As alterações observadas em aves infectadas foram mais evidentes, com trombócitos atípicos e citoplasma espalhado, com núcleo alongado ou com dois núcleos. Essas células foram confirmadas por imunofluorescência com anticorpo anti-trombócito 11C3 (Lacoste-Eleaume *et al.*, 1994). Trombócitos sanguíneos também apresentaram alterações morfológicas durante a infecção em animais com alta parasitemia, com maior tamanho devido aumento da região citoplasmática, com presença de vários vacúolos e núcleo duplicado. As alterações morfológicas foram mais evidentes em aves infectadas em alta parasitemia tratadas com AG além de uma indução de duas vezes no número desses trombócitos atípicos quando comparado com a soma dos trombócitos normal e picnóticos dos outros grupos de aves. Com esses achados podemos inferir que a medula responde à infecção liberando trombócitos imaturos demais, o que é evidenciado pela morfologia encontrada, maiores e com núcleo alongado ou duplicado, o que caracteriza o crescimento nuclear antes de se dividir, ou ainda divisão do núcleo sem que haja citocinese. A liberação de trombócitos imaturos pela medula confirma o envolvimento desse tipo celular durante a evolução dessa infecção.

Polack *et al.* (1991) mostraram uma atividade citotóxica de plaquetas como mecanismo de defesa contra parasitos extra e intracelulares, como *Trypanosoma musculi*, *Schistosoma mansoni* e *Plasmodium falciparum* (estágio de esquizonte). Trabalhos recentes mostram o envolvimento de plaquetas na patogênese da malária cerebral (Faille *et al.*, 2009b; Cox & McConkey, 2010; Mast *et al.*, 2010; Bridges *et al.*, 2010). No entanto, nossos resultados são preliminares e necessitam de experimentos mais detalhados para verificar o mecanismo que envolve trombócitos na patogênese do modelo experimental aviário.

Diversos estudos têm demonstrado alterações histopatológicas durante a malária cerebral, com envolvimento de fatores que agravam o quadro de manifestações, em humanos e em modelos murinos (Hearn *et al.*, 2000; Sherman *et al.*, 2003; Idro *et al.*, 2005). Nossos resultados encontrados nas secções de baço, fígado e cérebro de aves infectadas com *P. gallinaceum*, tratadas ou não com AG, demonstram claramente lesões decorrentes da ação do parasito, além de sequestro de eritrócitos parasitados, principalmente, na microvasculatura cerebral.

Nossos resultados indicam ainda que as lesões são mais brandas em animais tratados com AG, no que se refere ao baço e cérebro, sugerindo fortemente o papel do NO nesse processo, como já descrito anteriormente (Ghigo *et al.*, 1995; Rudin *et al.*, 1997; Maneerat *et al.*, 2000; Macchi *et al.*, 2010). Em relação a secções de tecido cerebral, mesmo em modelos diferentes nossos resultados são semelhantes aos observados por Hearn *et al.* (2000) e Grau *et al.* (2003), que demonstraram sequestro de parasitos e leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos infectados com *P. berghei* e em crianças com malária *falciparum*, respectivamente.

Nossos resultados demonstraram ainda várias alterações no tecido cerebral decorrente da ação indireta do parasito ou de suas toxinas. Na fase crônica da infecção,

com regressão da parasitemia, foram encontradas áreas de cicatrização, o que caracteriza recuperação da lesão em decorrência da ação do parasito.

De acordo, com a com a literatura, todos os achados no tecido cerebral são característicos de malária cerebral, fato que confirma a importância do modelo estabelecido. São varias as alterações descritas no quadro de malária cerebral, mas o depósito de pigmento malárico na microvasculatura cerebral é crucial para o diagnóstico de encefalite malárica (Sullivan *et al.*, 1996). Nossos resultados demonstram em algumas secções capilares cheios de eritrócitos parasitados com presença de pigmento malárico, como demonstrado por microscopia polarizada, confirmando a morte do animal por malária cerebral.

O papel do NO na imunidade à malária já foi evidenciado, e tem atividade antimicrobiana sobre o estágio eritrocítico assexuado do parasito (Taylor-Robinson & Smith, 1999). Taylor-Robinson (1997) observou que a ativação da via metabólica L-arginina-NO exerce um efeito antimicrobiano sobre o *P. falciparum*, *P. berghei* e *P. chabaudi*, visto que as concentrações aumentadas de NO, possuem um efeito inibidor e, depois, matam o parasito em seu estágio assexuado. Isso pode explicar a alta parasitemia encontrada nos animais tratados com AG, uma vez que seus níveis de nitrito no plasma estão baixos em relação aos animais não tratados em alta parasitemia. No entanto, segundo Clark *et al.* (1992), alterações durante a malária cerebral estão associadas com altas concentrações de citocinas que podem levar a geração de NO na parede vascular, o qual cruza a barreira hematoencefálica causando alterações funcionais que incluem aumento da entrada de cálcio induzido por glutamato, elevada atividade da nNOS com elevada produção de NO neuronal em células pós-sináptica, aumento este que leva ao coma. Além disso, alterações na microcirculação causam hipoxia, podendo ocorrer um acúmulo de cálcio, que pode ativar a nNOS e eNOS (Brunet, 2001). 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.*, 1994). 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). 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).

Nossos resultados demonstram níveis de nitrito aumentados no plasma de animais não tratados em relação aos animais tratados, que permanece constante com parasitemias crescentes, nestes últimos. Ou seja, conforme ocorre aumento na parasitemia há aumento dos níveis de nitrito nos animais não tratados, mas isso não é verificado em animais tratados com AG. Dessa forma, o NO pode estar implicado na alta mortalidade observada nos animais tratados, e sua ausência poderia justificar a baixa mortalidade encontrada nos animais sem tratamento. Estes achados estão de acordo com os trabalhos de Clark *et al.* (1992) e Brunet (2001), que demonstram a participação do NO no desenvolvimento da doença, conforme aumento da parasitemia. 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 mononucleares 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 antiparasitário para o NO. No entanto, a participação do NO na malária aviária é evidenciada em estudos anteriores do nosso grupo (Macchi *et al.*, 2010) e corroboram com Ghigo *et al.* (1995) e Taylor-Robinson & Smith (1999), que evidenciaram a participação do NO na patogênese da malária em camundongos.

Dessa forma, estudos sobre a participação do NO na malária cerebral apresentam resultados controversos. Favre *et al.* (1999) sugeriram que a produção de NO não é essencial para o desenvolvimento da doença, onde camundongos C57BL deficientes de iNOS, infectados com *P. berghei* (cepa ANKA), não apresentaram alterações na sobrevivência e no desenvolvimento da malária cerebral.

Estudos envolvendo NO e malária demonstram resultados ambíguos, devido à produção de NO por diferentes isoformas da enzima e local de produção. No entanto, nossos resultados claramente demonstram a participação desse mediador na patogênese da malária, corroborando trabalhos anteriores (Ghigo *et al.*, 1995; Macchi *et al.*, 2010).

6. CONCLUSÃO

1. De acordo com os resultados obtidos o mensageiro químico óxido nítrico possui um papel importante no modelo experimental de malária cerebral induzida pelo *Plasmodium gallinaceum* em galinhas domésticas, já que animais tratados com aminoguanidina (inibidor de óxido nítrico sintase induzida) mostraram maior taxa de sobrevivência em relação aos animais não tratados.

2. A maior taxa de sobrevivência no grupo tratado com aminoguanidina está relacionada ao processo inflamatório mais brando nesses animais, devido a inibição da enzima iNOS, o que altera parâmetros hematológicos e bioquímicos, com uma tendência a normalidade no grupo tratado com AG.

3. Trombócitos apresentam um papel importante na doença já que ocorre uma maior mobilização dessas células da medula para o sangue com o desenvolvimento da infecção, o que evidencia sua participação no processo inflamatório, possivelmente no quadro de adesão vascular, da infecção malárica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERIO SO, DINIZ JA, SILVA EO, DE SOUZA W, DAMATTA RA. Cytochemical and functional characterization of blood and inflammatory cells from the lizard *Ameiva ameiva*. *Tissue Cell* 37:193-202, 2005.
- BENNET FG, WARREN M, CHEONG WH. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani and Gomes, 1941. II. The sporogonic stages in *Culex (culex) sitiens* Wiedmann. *Journal of Parasitology*, 52:647-652, 1966.
- BERENDT AR, TURNER GDH, NEWBOLD CL. Cerebral Malaria: The Sequestration Hypothesis. *Parasitology Today*, 10: 412-414, 1994.
- 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.
- BONADIMAN SF, MIRANDA FJB, RIBEIRO MLS, RABELO G, LAINSON R, SILVA EO, DAMATTA RA. Hematological parameters of *Ameiva ameiva* (Reptilia: Teiidae) naturally infected with hemogregarine: confirmation of monocytosis. *Veterinary Parasitology*, 171:146-150, 2010.
- BOU TLIS CS, WEINBERG B, BAKER J, BOCKARIE MJ, MGONE CS, CHENG Q and ANSTEY NM. Nitric oxide production and nitric oxide synthase activity in malaria-exposed Papua New Guinean children and adults show longitudinal stability and no association with parasitemia. *Infection and Immunity*, 72: 6932-6938, 2004.

- BREDT DS, SNYDER SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Review Biochemical*, 63:175-195, 1994.
- BRIDGES DJ, BUNN J, van MOURIK JA, GRAU G, PRESTON RJS, MOLYNEUX M, COMBES V, O'DONNELL JS, LAAT B, CRAIG A. Rapid activation of endothelial cells enables *P. falciparum* adhesion to platelet decorated von Willebrand factor strings. *Blood*, 115: 1472-1474, 2010.
- BRUCE-CHWATT LJ. Historical outline. In: Essential Malariology. London: William Heinemann, p. 1-9, 1980.
- BRUNET LR. Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology*, 1: 1457-1467, 2001.
- CAMPBELL TW. Avian Hematology and Cytology. Ames: Iowa State University Press, p. 12-13, 1995.
- CAMPBELL TW. Hematology of birds. In: Thrall, M.A. et al. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, p. 225 – 258, 2004.
- CAMPBELL TW. Bioquímica clinica de aves. In: THRALL MA et al. Hematologia e bioquímica clinica veterinária. São Paulo: Rocca, cap 32, 2007.
- CARDOSO ALSP, TESSARI ENC, CASTRO AGM. Estudo hematológico em aves inoculadas com *Salmonella gallinarum*. *Arquivos do Instituto Biológico*, 70:35-42, 2003.
- CARDOSO ALSP, TESSARI ENC. Estudo dos parâmetros hamatologicos em frangos de corte. *Arquivos do Instituto Biológico*, 70:419-424, 2003.
- CHANG C, HAMILTON PB. The thrombocyte as the primary circulating phagocyte in chickens. *Journal of Reticuloendothelial Society*, 25: 585-590, 1979.

- CLARK IA, ROCKETT KA and COWDEN WB. Proposed link between cytokines, nitric oxide and human cerebral malaria. *Parasitology Today*, 7(8): 205-207, 1991.
- CLARK IA, ROCKETT KA and COWDEN WB. Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. *The Lancet*, 340 (8824): 894-896, 1992.
- CLARK IA, AL YAMAN FM and JACOBSON LS. The biological basis of malaria disease. *International Journal for Parasitology*, 27: 1237-1249, 1997.
- CLARK IA, COWDEN WB. The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacology Therapy*, 99: 221-60, 2003.
- CORBETT JA, MCDANIEL ML. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Methods in Enzymology*, 268: 398-408, 1996.
- COX D, McCONKEY S. The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Molecular Life Sciences*, 67: 557-568, 2010.
- DAMATTA R, MANHÃES LDS, SEABRA SH, DE SOUZA W. Co-culture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. *Biocell*, 22: 45-52, 1998a.
- DAMATTA RA, SEABRA SH, DE SOUZA W. Further studies on the phagocytic capacity of chicken thrombocytes. *Journal submicroscopy cytology and pathology*, 30:271-277, 1998b.
- DAMATTA RA, MANHÃES L, LASSOUNSKAIA E, DE SOUZA W. Chicken thrombocytes in culture: lymphocyte-conditioned medium delays apoptosis. *Tissue Cell*, 31:255-263, 1999.
- 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.

- 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 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.
- ERICSSON JLE, NAIR MK. Electron microscopy demonstration of acid phosphatase activity in the development and mature heterophils of the chicken. *Histochemistry* 37: 97-105, 1973.
- 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.
- FAILLE D, EL-ASSAAD F, ALESSI MC, FUSAI T, COMBES V, GRAU GE. Platelet-endothelial cell interactions in cerebral malaria: the end of a cordial understanding. *Thrombocytes Haemostasis*, 102:1093-1102, 2009a.
- FAILLE D, COMBES V, MITCHELL AJ, FONTAINE A, JUHAN-VAGUE I, ALESSI MC, CHIMINI G, FUSAI T, GRAU GE. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *The FASEB Journal*, 23: 3449-3458, 2009b.

- FAVRE N, RYFFEL B, RUDIN W. Parasite killing in murine malaria does not require nitric oxide production. *Parasitology*, 118: 139-43, 1999.
- FERRIS DH, BEAMER PD and STUTZ DR. Observations on the response of dysgammaglobulinemic chickens to malarial infection. *Avian Disease*, 17(1): 12-23, 1973.
- FÖRSTERMANN U, CLOSS EI, POLLOCK JS, NAKANE M, SCHWARZ P, 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.
- FUDGE AM. Laboratory medicine - avian and exotic pets. Philadelphia: WB Saunders Company, 467 p, 2000.
- GARCIA BA, SMALLEY DM, CHO HJ, SHABANOWITZ J, LEY K, HUNT DF. The platelet microparticle proteome. *Journal Proteome Research*, 4:1516-1521, 2005.
- GARNHAM PCC. Malaria Parasites and Other Haemosporidia. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1966.
- GHIGO D, TODDE R, GINSBURG H, COSTAMAGNA C, GAUTRET P, BUSSOLINO F, ULLIERS D, GIRIBALDI G, DEHARO E, GABRIELLI G, PESCARMONA G, 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.
- GRAU GE, TACCHINI-COTTIER F, VESIN C, MILON G, LOU JN, PIGUET PF, JUILLARD P. TNF-induced microvascular pathology: active role for platelets and

- importance of the LFA-1/ICAM-1 interaction. *European Cytokine Network*, 4:415-419, 1993.
- GRAU GE, MACKENZIE CD, CARR RA, REDARD M, PIZZOLATO G, ALLASIA C, CATALDO C, TAYLOR TE and MOLYNEUX ME. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *Journal Infectious Disease*, 187: 461-6, 2003.
- GREEN LC, WAGNER DA, SKIPPER PL. Analyses of nitrate, nitrite and nitrite in biological fluids. *Annals Biochemistry*, 126:131-138, 1982.
- 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.
- GREENBAUM DC, FITZGERALD GA. Platelets, pyrexia and plasmodia. *The New England Journal of Medicine*, 361: 526-528, 2009.
- GREENBERG J, TREMBLEY HL, COATNEY GR. Effects of drugs on *Plasmodium gallinaceum* infections produced by decreasing concentrations of a sporozoite inoculum. *American Journal Epidemiology*, 51:194-199, 1950.
- HALDAR K, HILLER NL, van OOIJ C, BHATTACHARJEE S. *Plasmodium* parasite proteins and the infected erythrocyte. *Trends in Parasitology*, 21: 402-403, 2005.
- HARMON BG, BLISSON JR. Disassociation of bacterial and fungistatic activities from the oxidative burst of avian macrophages. *American Journal of Veterinary Research*. 51: 71-75, 1993.
- HARR KE. Clinical chemistry of companion avian species: A Review. *Veterinary Clinical Pathology*, 3: 140-149, 2002.
- HE W, NEIL S, KULKARNI H, WRIGHT E, AGAN BK, MARCONI VC, DOLAN MJ, WEISS RA, AHUJA SK. Duffy antigen receptor for chemokines mediates trans-

- infection of HIV-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS susceptibility. *Cell Host Microbe*, 4:52-62, 2008.
- 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.
- 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.
- 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.
- IDRO R, JENKINS NE and NEWTON CR. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *The Lancet Neurology*, 4: 827-40, 2005.
- 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.
- JAIN NC. Essentials of hematology. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1993.
- JARAMILLO M, PLANTE I, OUELLET N, VANDAL K, TESSIER PA and OLIVIER M. Hemozoin-Inducible Proinflammatory Events In Vivo: Potential Role in Malaria Infection1. *The Journal of Immunology*, 172: 3101-3110, 2004.
- KANEKO JJ, HARVEY JW, BRUSS ML. Clinical biochemistry of domestic animals. 5a ed. London: Academic Press, 932 p, 1997.
- KELLER CC, KREMSNER PG, HITTNER JB, MISUKONIS MA, WEINBERG JB, PERKINS DJ. Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infection Immunology*, 72: 4868-73, 2004.
- KIRCHGATTER K, DEL PORTILLO HA. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77: pags? - Rio de Janeiro, 2005.
- KRETTLI AU. *Plasmodium juxtannucleare* 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:pags., 1994.
- KRETTLI AU, DANTAS LAB. Which routes do *Plasmodium* sporozoites use for successful infections of vertebrates? *Infection and Immunity*, 68: 3064-3065, 2000.

- KRETTLI AU, ANDRADE-NETO VF, BRANDÃO MG, FERRARI WM. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96:1033–1042, 2001.
- LACOSTE-ELEAUME AS, BLEUX C, QUÉRÉ P, COUDERT F, CORBEL C, KANELLOPOULOS-LANGEVIN C. Biochemical and functional characterization of an avian homolog of the integrin GPIIb-IIIa present on chicken thrombocytes. *Experimental Cell Research*, 213:198-209, 1994.
- LANGHORNE J. The immune response to the blood stages of *Plasmodium* in animal models. *Immunology Letters*, 41: 99-102, 1994.
- LOCHER CP, RUBEN PC, GUT J, ROSENTHAL PJ. 5HT1A serotonin receptor agonists inhibit *Plasmodium falciparum* by blocking a membrane channel. *Antimicrobials Agents Chemotherapy*, 47:3806-3809, 2003.
- LOPES STA, BIONDO AW, SANTOS AP. Manual de patologia clínica veterinária. 3ª Ed. UFSM, Santa Maria, 2007.
- LUCAS AM, JAMROZ C. Atlas of avian hematology. Agricultural Monograph. 25, United States Department of Agriculture, Washington D.C., 1961.
- LUMEIJ JT. Avian Clinical Biochemistry. In: Kaneko JJ; Harvey JW; Bruss ML. Clinical Biochemistry of Domestic Animals 5th edition. San Diego, Academic Press, 1997.
- MACCHI BM, QUARESMA JAS, HERCULANO AM, CRESPO-LÓPEZ ME, 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.
- MAITLAND K, NEWTON CR. Acidosis of severe falciparum malaria: heading for a shock? *Trends in Parasitology*, 21:11-16, 2005.

- MANEERAT Y, VIRIYAVEJAKUL P, PUNPOOWONG B, JONES M, WILAIRATANA P, PONGPONRATN E, TURNER GD, UDOMSANGPETCH R. Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. *Histopathology*, 37:269-277, 2000.
- MASSARD CL. Caracterização do parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidea: Plasmodiidae) em criações de *Gallus gallus* L. da raça Leghorn Branca. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, 5:141-146, 1982.
- MAST Q, GROOT PG, VAN HEERDE W, ROESTENBERG M, VAN VELZEN JF, VERBRUGGEN B, ROEST M, MCCALL M, NIEMAN AE, WESTENDORP J, SYAFRUDDIN D, FIJINHEER R, VAN DONGEN-LASES EC, SAUERWEIN RW, VAN DER VEN AJ. Thrombocytopenia in early malaria is associated with GPIb shedding in absence of systemic platelet activation and consumptive coagulopathy. *British Journal of Haematology*, 151:495-503, 2010.
- MAXWELL MH, ROBERTSON GW. The avian basophilic leukocyte: a review. *World's Poultry Science Journal*, 3: 307-325, 1995.
- MAXWELL MH, ROBERTSON GW. The avian heterophil leukocyte: a review. *World's Poultry Science Journal*, 2: 155-178, 1998.
- MAXWELL MH, SILLER WG. The ultrastructural characteristics of the eosinophil granules in six species of domestic bird. *Journal of Anatomy*, 2: 289-303, 1972.
- MCCUTCHAN TF, KISSINGER JC, TOURAY MG, ROGERS MJ, LI J, SULLIVAN M, BRAGA EM, KRETTLI AU, MILLER LH. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarial parasites: Biological and phylogenetic implications (*Plasmodium* apicomplexa evolution sporozoite invasion cell adhesion motif). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 11889-11894, 1996.

- MEDANA IM, CHAUDRHI G, CHAN-LING T, HUNT NH. Central nervous system in cerebral malaria: 'Innocente bystander' or active participant in the induction of immunopathology? *Immunology and Cell Biology*, 79: 101-120, 2001.
- 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.
- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43:109-142, 1991.
- MONTALI RJ. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of Comparative Pathology*, 99:1-26, 1988.
- MOORE SA, SURGEY EG, CADWGAN AM. Malaria vaccines: where are we and where are we going? *Lancet Infectious Diseases*, 2:737-43, 2002.
- MOTA RA. Variáveis hematológicas em *Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758, de criações rústicas da região metropolitana do Recife, naturalmente infectados com *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 58p, 1997.
- MOTA RA, CUNHA ELP, ALVES LC, MASSARD CL. Variáveis Hematológicas em *Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758, de criações rústicas da região metropolitana do Recife, naturalmente infectadas com *Plasmodium juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941). *Ciência Veterinária nos Trópicos*. Recife. 1:76–80, 1998.
- OGUZ H, KURTOGLU F, KURTOGLU V, BIRDANE YO. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Research in Veterinary Science*, 73: 101-103, 2002.

- OLIVEIRA-FERREIRA J, LACERDA MVG, BRASIL P, LADISLAU JLB, TAUIL PL, DANIEL-RIBEIRO CT. Malaria in Brasil: na overview. *Malaria Journal*, 9:115-129, 2010.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. www.oms.org, 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, JUHL J. The development of *Plasmodium gallinaceum* infections in chickens following single infections with three different dose levels. *Veterinary Parasitology*, 105: 1-10, 2002.
- PLEASS RJ. Platelet Power: sticky problems for sticky parasites? *Trends in Parasitology*, 25:296-299, 2009.
- POLACK B, PEYRON F, AURIAULT C. Platelet cytotoxicity against parasites. *Journal of Experimental and Clinical Hematology*, 33:317-322, 1991.
- 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.

- QUEZADA T, CUÉLLAR H, JARAMILLO-JUÁREZ F, VALDIVIA AG, REYES JL. Effects of aflatoxin B₁ on the liver and kidney of broiler chickens during development. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 125: 265–272, 2000.
- QURESHI MA. Avian macrophage and immune response: an overview. *Poultry Science*, 82: 691-698, 2003.
- 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 Evolution*, 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.
- SCHMIDT EMS, LOCATELLI-DITTRICH R, SANTIN E, PAULILLO AC. Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – Revisão. *Archives of Veterinary Science*, 12: 9-20, 2007.
- SHERMAN IW, EDA S, WINOGRAD E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes and Infection*, 5: 897-909, 2003.
- SIDDALL ME, BARTA JR. Phylogeny of *Plasmodium* species: estimation and inference. *Journal of Parasitology* 78, 567–568, 1992.
- 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) juxtannucleare*. *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.
- Soares *et al.*, 1999
- SONI JL and COX HW. Pathogenesis of acute avian malaria. II. Anemia mediated by a cold-active autohemagglutinin from the blood of chickens with acute *Plasmodium gallinaceum* infection. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 24: 206-13, 1975a.
- SONI JL and COX HW. Pathogenesis of acute avian malaria. III. Antigen and antibody complexes as a mediator of anemia in acute *Plasmodium gallinaceum* infections of chickens. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 24: 423-30, 1975b.
- SOULSBY E JL. Helminths, Anthropods and Protozoa of Domesticated Animals, 6th ed. Bailliére Tindall, London, 1982.
- SPRINGER WT. Other blood and tissue protozoa. In: CALNEK BW, BEARD CW, MCDUGALD LR, SAIF YM (Eds.). Diseases of Poultry. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 900–911, 1996.
- SRIVASTAVA K, COCKBURN IA, SWAIM A, THOMPSON LE, TRIPATHI A, FLETCHER CA, SHIRK EM, SUN H, KOWALSKA MA, FOX-TALBOT K, SULLIVAN D, ZAVALA F, MORRELL CN. Platelet factor 4 mediates inflammation in experimental cerebral malaria. *Cell Host Microbe*, 4:179-187, 2008.

- STAINES HM, GODFREY EM, LAPAIX F, EGEE S, THOMAS S, ELLORY C. Two functionally distinct organic osmolyte pathways in *Plasmodium gallinaceum*-infected chicken red blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1561: 98-108, 2002.
- SULLIVAN AD, ITTARAT I and MESHNICK SR. Patterns of haemozoin accumulation in tissue. *Parasitology*, 112: 285-94, 1996.
- SWANN A. The Relationship of erythrocyte age and parasitization with *Plasmodium gallinaceum* in Chickens. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 38:391-397, 1974.
- 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.
- TAYLOR-ROBINSON AW. Antimalarial activity of nitric oxide: cytostasis and cytotoxicity towards *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Society Transactions*, 25: 262S, 1997.
- TAYLOR-ROBINSON AW, SMITH EC. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunology Letters*, 67: 1 – 9, 1999.
- TENNANT BC. Hepatic Function. In: Kaneko JJ; Harvey JW; Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 5th edition. San Diego, Academic Press, 1997.
- THRALL MA, BAKER DC, CAMPBELL TW, DENICOLA D, FETTMAN MJ, LASSEN ED, REBAR A, WAISER G. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2007. 582p.
- TOPP RC, Carlson HC. Studies on avian heterophils. III. Phagocytic properties. *Avian Disease*, 16:374–380, 1972.
- VALKIUNAS G. *Avian malaria parasites and other Haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, FL, 936 p. 2005.

- VIEIRA DP. Avaliação dos efeitos da inibição de cadeias inflamatórias e da suplementação exógena de CXCL12 na hematopoiese de modelos experimentais expostos a doses letais ou subletais de radiação gama. Tese de doutorado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, São Paulo, Rio de Janeiro, 72p, 2007.
- 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 sulphadoxine against *Plasmodium gallinaceum* malaria in the domesticated fowl *Gallus gallus*. *Veterinary Parasitology*, 129: 193-207, 2005.
- WRIGHT RH, KREIER JP. *Plasmodium gallinaceum*: chicken erythrocyte survival as determined by sodium radiochromate 51 and di-isopropylfluorophosphate 32 labeling. *Experimental Parasitology*, 25: 339-352, 1969.