

BARBARELLA DE MATOS MACCHI

MODELO EXPERIMENTAL DE
MALÁRIA CEREBRAL AVIÁRIA

BELÉM-PARÁ

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

2006

BARBARELLA DE MATOS MACCHI

MODELO EXPERIMENTAL DE
MALÁRIA CEREBRAL AVIÁRIA

Dissertação apresentada 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 Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

BELÉM-PARÁ

2006

BARBARELLA DE MATOS MACCHI

MODELO EXPERIMENTAL DE MALÁRIA CEREBRAL AVIÁRIA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular, a ser avaliada pela comissão formada pelos professores:

Orientador:

Dr. José Luiz Martins do Nascimento
Departamento de Fisiologia
Universidade Federal do Pará

Banca examinadora:

Dra. Claudia do Ó Pessoa
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará

Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro
Núcleo de Medicina Tropical
Universidade Federal do Pará

Dra. Rosana Maria Feio Libonati
Núcleo de Medicina Tropical
Universidade Federal do Pará

Membro suplente:

Dra. Maria Elena Crespo Lopez
Departamento de Fisiologia
Universidade Federal do Pará

Belém, maio de 2006.

“Se vi mais longe,
foi por estar em pé

sobre ombros de gigante.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À Deus, obrigada pela saúde e pelas pessoas que colocastes no meu caminho.

Aos meus pais Luigi e Estelina, fontes de valores, incentivo e confiança. Obrigada pela preocupação, pelo carinho na hora certa, as risadas nos raros finais de semana, por compreender minha ausência e, principalmente, pelo respeito na escolha que fiz.

Ao professor José Luiz, além de orientador um grande amigo. Obrigada por acreditar em mim (não sabes o quanto foi importante!!) e possibilitar a realização deste trabalho. Agradeço ainda pelas discussões que enriqueceram meu conhecimento.

Ao Dr. Juarez Quaresma, pela colaboração valiosa na execução dos exames histopatológicos. Obrigada!!

Ao amigo Renato DaMatta, pelas dicas, pelos puxões-de-orelha, pelas técnicas que com paciência me ensinou, pela estadia, pelo incentivo... enfim, obrigada pro tudo!!!

A Dra. Maristela, pela disposição incansável ao ajudar na elaboração deste trabalho. Obrigada.

À minha irmã-mãe Gigi, sempre comigo quando eu precisei (obrigada por tomar conta de mim, minha brabinha). Minha “pincezo” Bia, pelos seus sorrisos inocentes e sua frase “Não fica ‘tiste’!” nos momentos difíceis. Minha irmã distante, Paloma, obrigada pela coisa mais fofa: meu sobrinho Henrique, com aquele riso doce que encanta. Amo todos vocês.

À minha querida tia “Helô”, por me auxiliar nas coisas que precisei, pela paciência e, principalmente, pela alegria irradiante que renovava minhas forças. Minha prima Alinne, que mesmo distante, esteve sempre perto de mim o tempo todo. Vocês são especiais.

Dona Deuza?! Nem sei como agradecer... sempre “quebrando-galhos”. Obrigada pelas palavras amigas, pela força e por sempre me encorajar. Obrigada “mãe”.

Aos meus grandes e eternos amigos Lauze Lee, Gemilson e Luciana Leal, pelos momentos de alegrias ou mesmo de tensões que sempre dividimos. Lembram das patéticas?! Obrigada pela amizade de vocês.

Aos amigos Vanessa e Daniel... sempre me ajudando, até nas horas da tristeza. Van, não tenho palavras pra colocar aqui, mas obrigada por não me deixar sozinha.

Ao Herculano, que com sua chatice e humor ímpar, foi muito importante no desenvolvimento deste trabalho, além de me fazer rir até mesmo das coisas chatas que aconteceram.

Ao pessoal do Laboratório de Neuroquímica: Elena Crespo, Luís, Dedê (Denise), Andreinha (Andréa), Karen, Adelaide, Andréia, Tatiane, Tarcyane, Ywilliane e Gustavo, sempre perto, transmitindo força e alegrias. Pelas conversas úteis e fúteis, que rendiam belas gargalhadas.

No fim, mas não menos importante, meu Muito Obrigada! ao pessoal do Biotério do Centro de Ciências Biológicas, em especial Amarildo e Marcelo, sem ajuda dos quais, este trabalho não seria realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 MALÁRIA	01
1.1.1 Considerações gerais	01
1.2 MALÁRIA EM HUMANOS	04
1.2.1 Ciclo de vida do gênero <i>Plasmodium</i> em seres humanos	04
1.2.2 Manifestações clínicas	08
1.2.3 Imunologia da malária	10
1.2.4 Fisiopatologia da malária	13
1.3 ÓXIDO NÍTRICO	18
1.3.1 Óxido Nítrico Sintase (NOS)	19
1.3.2 Fisiologia do NO	21
1.3.3 Implicações do NO na malária cerebral	22
1.3 MALÁRIA EM AVES	26
1.3.1 Considerações gerais	26
1.3.2 O ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> em aves	27
1.4 O SISTEMA IMUNE NAS AVES	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 GERAL	31
2.2 ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 CEPA DO PARASITO	32
3.2 AVES	32
3.3 INFEÇÃO EXPERIMENTAL	33

3.4 DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA	33
3.5 AVES COM INFECÇÃO CRÔNICA	33
3.6 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS	34
3.7 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DO HEMATÓCRITO	34
3.8 OBTENÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL	34
3.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÉREBRO	34
3.10 ATIVIDADE BIOQUÍMICA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS) ...	35
3.11 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	36
3.12 ANÁLISE POR CINTILAÇÃO LÍQUIDA	36
3.13 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS	37
3.14 CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE AVES	38
3.15 OBTENÇÃO DE INTERFERON-γ DE GALINHA	39
3.16 CULTIVO E ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS	39
3.17 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS	40
.....	
3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4 RESULTADOS	41
4.1 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS	41
4.2 MORTALIDADE	43
4.3 PARASITEMIA	45
4.4 VALORES DE HEMATÓCRITO	46
4.5 TEMPERATURA	48
4.6 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS DOS ÓRGÃOS	48
4.7 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS CÉREBROS DE AVES INFECTADAS COM <i>Plasmodium gallinaceum</i>	51
4.8 ATIVIDADE DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE EM CÉREBROS DE ANIMAIS INFECTADOS COM <i>Plasmodium gallinaceum</i>	55
4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO	58
5 DISCUSSÃO	60
5.1 DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA CEREBRAL	61
5.2 MODELO EXPERIMENTAL DE MALÁRIA CEREBRAL	62
5.2.1 Taxa de mortalidade	62
5.2.2 Manifestações clínicas	63
5.2.3 Achados histopatológicos no cérebro	66
5.2.4 Efeito da infecção por <i>P. gallinaceum</i> na atividade da nos em cérebros	67

5.2.5 Produção de NO por macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico	69
6 CONCLUSÕES	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição do <i>Plasmodium falciparum</i> em áreas de risco	03
Figura 2 – Ciclo de vida do gênero <i>Plasmodium</i>.	07
Figura 3 – Representação esquemática da citoaderência e do fenômeno “rosetting” ..	16
Figura 4 – Isoformas da enzima NOS e seus mecanismos de ativação	20
Figura 5 – Esquema com funções fisiológicas do NO relevantes na patogênese da malária	25
Figura 6 – Gráfico que demonstra mortalidade de animais infectados com <i>Plasmodium gallinaceum</i>	44
Figura 7 – Gráfico que demonstra correlação entre os valores de hematócrito e os níveis de parasitemia.....	47
Figura 8 – Gráfico que demonstra correlação entre os valores da temperatura e os níveis de parasitemia	49
Figura 9 – Análises macroscópicas dos órgãos de aves controles e infectadas com <i>Plasmodium gallinaceum</i>.	50
Figura 10 – Fotomicrografias de secções de tecido cerebral de aves infectadas pelo <i>P. gallinaceum</i> coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina	52
Figura 11 – Fotomicrografias de secções de tecido cerebral de aves infectadas pelo <i>P. gallinaceum</i> coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina	53
Figura 12 – Fotomicrografias de secções de tecido cerebral de aves infectadas	

pelo <i>P. gallinaceum</i> coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina.	54
Figura 13 – Gráfico comparativo da atividade da NOS em cérebro de animais não infectados e infectados com <i>Plasmodium gallinaceum</i>	57
Figura 14 – Gráfico comparativo da produção de óxido nítrico por macrófagos derivados de monócitos de animais com infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> ..	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCI – fenômeno de inibição celular dependente de anticorpo
AG – aminoguanidina
APCs – células apresentadoras de antígenos
BSA – albumina bovina sérica
CAMs – moléculas de adesão celular
CS – proteína circumesporozoíto
DMEM – meio de cultura: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DTT – ditioneitol
EDRF – fator de relaxamento derivado do endotélio
ELAM-1 – molécula de adesão endotelial 1
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
FBS – soro fetal bovino
GMPC – guanosina monofosfato cíclica
GPI – glicosil-fosfatidil-inositol

ICAM-1 – molécula de adesão intercelular 1

IgG1 – imunoglobulina de classe 1

IgG3 – imunoglobulina de classe 3

IL – interleucina

IL-1 – interleucina-1

IL-10 – interleucina-10

IL-1 α – interleucina-1 alfa

IL-1 β – interleucina-1 beta

IL-6 – interleucina-6

INF- γ – interferon

iNOS – óxido nítrico sintase induzida

L-NAME – L-arginil-metil-éster

L-NARG – L-nitroarginina

LPS – lipopolissacarídeo de *E. coli*

LT – linfotoxina

NADPH –

NaOH – hidróxido de sódio

NMDA – N-metil-D-aspartato

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

PfEMP1 – proteína de membrana de eritrócito de *Plasmodium falciparum*

RCA – reagente cupro-alcalino

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

TGF- β – fator de crescimento tumoral-*beta*

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

VCAM-1 – molécula de adesão vascular

RESUMO

A malária, uma infecção causada por protozoário do gênero *Plasmodium*, continua sendo de grande importância no contexto social, pois é responsável por milhões de casos clínicos, levando à morte grande número de pessoas. Sua patologia está associada a vários fatores, dentre eles as diferentes formas do parasito durante seu ciclo evolutivo. Devido sua grande relevância, diversos modelos foram desenvolvidos com finalidades de entender a fisiopatologia da doença, os mecanismos de interação parasito-hospedeiro, sua quimioterapia, bem como suas implicações nos diferentes modelos estudados. Neste trabalho, desenvolvemos um modelo experimental de malária cerebral em galinhas domésticas infectadas com *Plasmodium gallinaceum*. É um modelo interessante, pois apresenta alterações neurais, como seqüestro de eritrócitos na microvasculatura e presença de pigmento malárico no tecido cerebral, que caracteriza encefalite malárica. Durante a caracterização do modelo experimental podemos observar a participação do óxido nítrico, que é um mensageiro químico implicado em fenômenos relacionados a neurotoxicidade e parece regular a neurofisiopatologia de malária cerebral.

ABSTRACT

Malaria, an infection caused by a protozoa of *Plasmodium* genus, continues to have a great importance in the social context, because it is responsible for many clinics cases that takes a large number of people in the world and can leading death. Its pathology is associated with various factors, among them the different forms of the parasites during the evolutive cycle. Because of its great relevance, various models have been developed to studies, like to understand the mechanisms of parasite-host interaction, chemotherapy and its pathologic implications. In this work, we developed an experimental model of cerebral malaria in *Plasmodium gallinaceum*-infected domestic chickens. It is an interesting model because it shows neural alterations, as erythrocytes sequestration in the microvasculature and malaric pigment presence in the cerebral tissue. Other factor to be showed in this work is the participation of nitric oxide, an intracellular messenger implicated in differents conditions of cerebral malaria, which seems to regulate involved neuroxicity in the cerebral malaria.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

1.1.1 Considerações gerais

Malária é uma das mais importantes doenças infecciosas do mundo, com uma incidência em cerca de 90 países, e causa 250-500 milhões de casos clínicos e 2-3 milhões de mortes ao ano (Snow *et al.*, 2005). Causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida ao homem pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles*, é caracterizada pela tríade: febre, calafrio e cefaléia (Clark *et al.*, 1997; Taylor-Robinson, 2000; de Souza & Riley, 2002).

A palavra malária, significando mau ar (mal'aria), surgiu no século XVII, na Itália, devido os casos de febre romana serem atribuídos ao mau ar vindo dos pântanos. O parasito da malária convive há vários séculos na humanidade, uma vez que Hipócrates foi o primeiro a descrever as manifestações da doença, relacionando com época do ano e local de moradia das pessoas (Bruce-Chwatt, 1980). No entanto, somente em 1880, após observações de Laveran a cerca de episódios intermitentes de febre e com a identificação do protozoário responsável pela doença, a malária foi conceituada, e em 1897 demonstrado como vetor, um mosquito do gênero *Anopheles* (Bruce-Chwatt, 1980; Slater, 2005).

Os agentes causadores da malária são protozoários pertencentes à família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Mais de 200 espécies de *Plasmodium* já foram identificadas, dentre elas, parasitos de primatas, répteis, mamíferos não primatas e aves (Schall, 1990; Slater, 2005). Para a doença em humanos, foram reconhecidas apenas quatro espécies: *Plasmodium (Plasmodium) vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium (Laverania) falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium (Plasmodium) malariae* (Laveran,

1881; Grassi & Feletti, 1890) e *Plasmodium (Plasmodium) ovale* (Stephens, 1922) (Bruce-Chwatt, 1980). As quatro espécies possuem como característica comum episódios febris bem como outros possíveis sintomas, dependendo da espécie. O *Plasmodium ovale* foi o último a ser caracterizado, no entanto as outras três espécies possuem um longo histórico médico definido por suas sintomatologias. Conhecida por febre intermitente, a malária foi caracterizada pela severidade e periodicidade de seus acessos febris (Okoko *et al.*, 2003). Apesar de existir apenas quatro espécies que parasitam o homem, elas possuem uma grande variabilidade genética, reconhecida pela variação na resposta imune e/ou resistência a diferentes drogas, o que dificulta o entendimento da doença e sua erradicação (Pirrit *et al.*, 2000). No Brasil encontramos apenas as três primeiras espécies, sendo o *Plasmodium vivax* o mais predominante, com cerca de 70 % a 90 % dos casos. Apesar de ser não ser o mais predominante, vindo em seguida ao *P. vivax* (Ministério da Saúde/ FUNASA, 2003), o *Plasmodium falciparum* figura como a principal causa de morte dentre as infecções maláricas, e está amplamente distribuído em vários países (figura 1) (Snow *et al.*, 2005).

Entre as demais espécies, destacamos o *Plasmodium simium* e o *Plasmodium brasilianum* como parasitos de primatas não humanos, morfologicamente semelhantes aos *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, respectivamente. Em outros modelos de malária, encontramos os *Plasmodium vinckei*, *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium berghei*, causadores de malária em roedores. As duas primeiras espécies causam malária fatal e não fatal, respectivamente, enquanto cepas específicas de *Plasmodium berghei* são amplamente utilizadas para estudos de malária cerebral (De Souza & Riley, 2002).

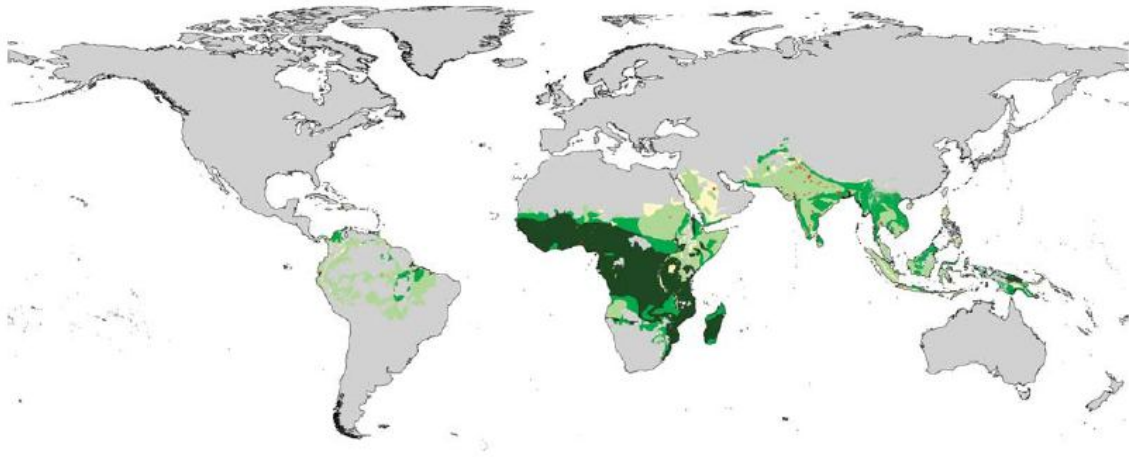


Figura 1: Distribuição do *Plasmodium falciparum* em áreas de risco. Áreas endêmicas: verde claro, hipoendêmica (áreas onde a prevalência é <10%); verde médio, mesoendêmica (áreas onde a prevalência está entre 11% e 50%); verde escuro, hiperendêmica e holoendêmica (áreas onde a prevalência é >50%). Áreas não classificadas: amarelo, 6% da população global dentro de áreas de risco; cinza, áreas fora dos limites de transmissão, onde a densidade populacional é bem menor. Fonte: adaptado de Snow *et al.*, 2005.

Todas as espécies de *Plasmodium* são transmitidas para seus hospedeiros intermediários por mosquitos de um único gênero, denominado *Anopheles*. Há cerca de 400 espécies de anofelinos, destas, 60 espécies podem transmitir a malária ao homem (Xavier & Rebelo, 1999; Póvoa *et al.*, 2000). No Brasil, as principais espécies de vetores são: *Anopheles darlingi*, *Anopheles aquasalis* e *Anopheles albitalis*, sendo o de maior importância o *Anopheles darlingi*, responsável pelos casos no interior do país e o *Anopheles aquasalis*, responsável pela transmissão no litoral (Póvoa *et al.*, 2000; Ministério da Saúde/ FUNASA, 2003). Além de transmitida ao hospedeiro humano através da picada do mosquito fêmea infectado (hematófaga), caracterizando a transmissão de pessoa a pessoa, a malária pode ser transmitida por transfusão sanguínea, agulhas contaminadas e via neonatal (Clark *et al.*, 1997; Okoko *et al.*, 2003).

1.2 MALÁRIA EM HUMANOS

1.2.1 Ciclo de vida do gênero *Plasmodium* em seres humanos

Para se reproduzir, o parasito da malária necessita de dois hospedeiros – um artrópode (hospedeiro definitivo) e um vertebrado (hospedeiro intermediário) – caracterizando um ciclo do tipo heteroexênico: o ciclo assexuado ou esquizogônico, ocorre no hospedeiro vertebrado (homem, roedores, aves) e o ciclo sexuado, ou esporogônico, ocorre no hospedeiro invertebrado (mosquito). Os plasmódios possuem um complexo ciclo de vida, com início logo após a picada do mosquito, que injeta na corrente sanguínea formas conhecidas como esporozoítos (que é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado) e encontram-se 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 as células do

fígado (hepatócitos). No interior dos hepatócitos, o parasito reproduz assexuadamente, formando os esquizontes hepáticos. Após 4 a 12 dias, dependendo da espécie, as células parasitadas se rompem e liberam os merozoítos nos capilares intra-hepáticos (Moore *et al.*, 2002; Jaramillo *et al.*, 2004; Slater, 2005).

Nas infecções por *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*, os esquizontes teciduais são liberados ao mesmo tempo, enquanto que nas infecções por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium 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 se reproduzir assexuadamente, originando milhares de merozoítos, que por sua vez, transformam-se em trofozoítos jovens, que crescem, dividem-se e originam 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 e originam o hemozoína ou pigmento malárico, que 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 gametócitos masculinos e femininos, micro e macrogametócitos. Esses gametócitos circulantes são as formas infectantes para o mosquito (Moore *et al.*, 2002).

O ciclo no mosquito inicia-se quando o mesmo faz o repasto sangüíneo em um indivíduo portador das formas sexuadas do parasito. No estômago do mosquito o macrogametócito dá origem ao macrogameta e o microgametócito sofre mitoses

sucessivas, resultando em oito núcleos que formam microgametas, por um 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. Nesse local, adquire 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 2).

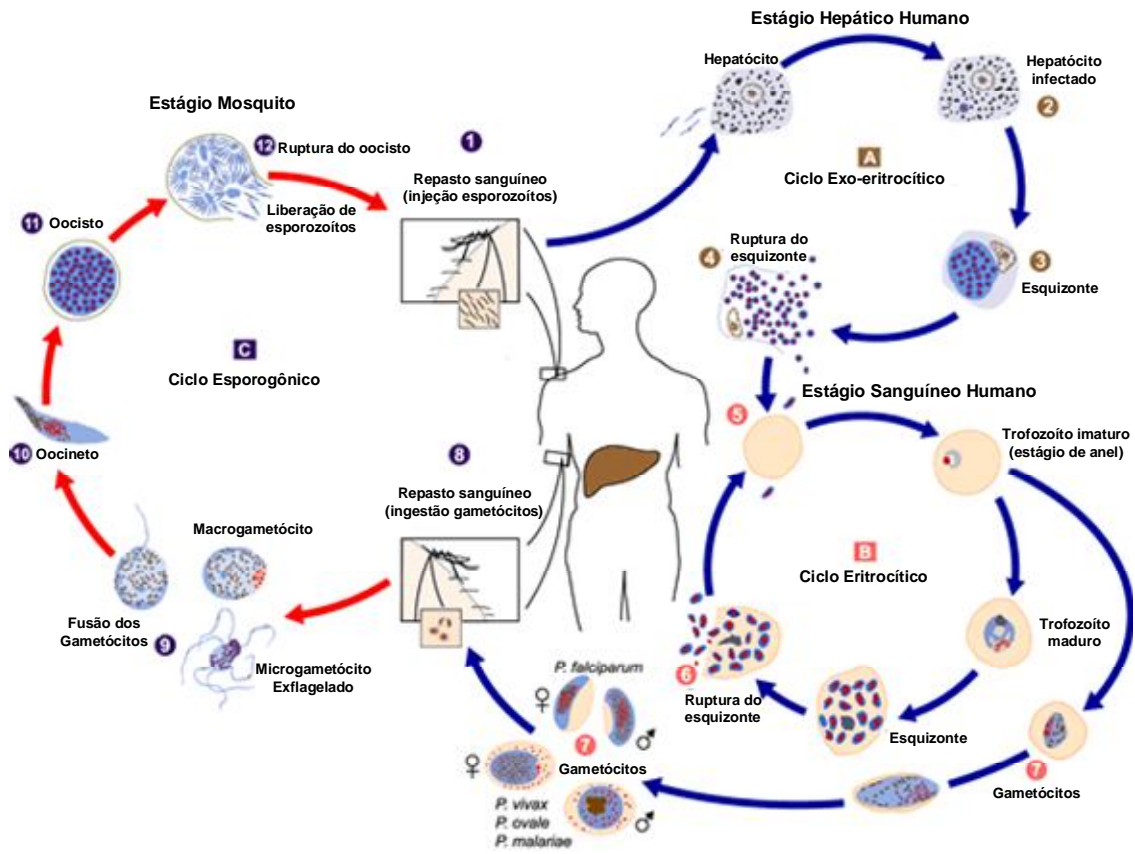


Figura 2. Ciclo de vida do gênero *Plasmodium* envolvendo o hospedeiro definitivo (invertebrado/mosquito) e o hospedeiro intermediário (vertebrado/homem). Fonte: www.uni-tuebingen.de/modeling/images/malaria_LifeCycle.gif

1.2.2 Manifestações clínicas

Com o início do ciclo eritrocítico, surgem às manifestações clínicas da malária. Os achados clínicos e patológicos são conseqüências de processos resultantes da invasão e ruptura da hemácia ou da obstrução de vasos capilares profundos. Hoje a patogenia da malária pode ser considerada como resultado da participação da resposta imune, principalmente com a produção de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral - TNF, interleucinas - IL, linfotoxinas - LT e interferon - INF). Existem diversos estudos que mostram a participação de citocinas ativadas pelo 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).

O quadro clínico inicial da malária é comum às quatro espécies de *Plasmodium* que parasitam o homem. Nos primeiros 15 dias da infecção, temos o período pré-patente e o indivíduo é assintomático. Após este período, a maioria das pessoas começa a manifestar febre alta acompanhada de calafrios, sudorese e cefaléia. Na fase inicial, estes sintomas apresentam-se irregulares ou contínuos e passa a ocorrer de forma cíclica (dependendo da espécie do parasito infectante) ao final da primeira semana. Estes sintomas são relacionados com a ruptura dos esquizontes. Além dessas, outras manifestações são características da infecção, tais como astenia, náuseas, vômitos, diarréia, dor abdominal, artralgia, mialgia, lombalgia, dispnéia, tosse e tontura. A doença vai progredindo com anemia, icterícia e hepatoesplenomegalia (Wroczynska *et al.*, 2005). Na malária causada por *Plasmodium falciparum*, também conhecida como malária grave ou severa, pode ocorrer alterações da consciência, crises convulsivas, coma e insuficiência renal, complicações estas responsáveis por elevada mortalidade (White, 1998; Shingadia & Shulman, 2000).

A febre, característica mais freqüente da doença está relacionada com a produção de interleucinas, principalmente IL-1 e IL-6, que parecem ter um papel importante como citocinas pirogênicas (Clark & Schofield, 2000; Hunt & Grau, 2003). Normalmente a febre é do tipo intermitente, com intervalos de 36 a 48 horas na infecção por *Plasmodium falciparum*, 48 horas para *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale* ou de 72 horas para *Plasmodium malariae* (Souza *et al.*, 1997). A capacidade de gerar febre também é atribuída ao TNF- α produzido por macrófagos (Karunaweera *et al.*, 2003).

A anemia é observada em conseqüência da destruição das hemácias durante a esquizogonia sanguínea, e pode apresentar-se em graus variáveis, já que grande quantidade de eritrócitos é mecanicamente destruída através do parasitismo intraeritrocítico. No entanto, na maioria dos casos a anemia não está correlacionada com a parasitemia, indicando que sua patogênese é multifatorial. Diversos fatores podem estar relacionados com o grau de hemólise, entre eles temos a destruição de eritrócitos parasitados e não parasitados através do sistema imune ou por alterações físico-químicas na membrana citoplasmática, que aumenta a atividade dos macrófagos e reduz a deformidade das células, levando ao bloqueio de vasos. Outro fator que pode influenciar no grau de hemólise é a disfunção na medula óssea, que pode ser observado na malária grave causada pelo *Plasmodium falciparum*, esta disfunção ocorre por uma redução da eritropoese devido à ação de citocinas, como o TNF- α (Daniel-Ribeiro & Ferreira-da-Cruz, 2000; Keller *et al.*, 2004; Jaramillo *et al.*, 2004).

A interação entre hospedeiro e parasito é fundamental para os sintomas da doença. Indivíduos que residem em áreas endêmicas, considerados como semi-ímmunes, ou pessoas com boa resposta do sistema imune, tendem a apresentar um quadro clínico leve ou ausente e baixa parasitemia (White, 1998; Shingadia & Shulman, 2000).

As manifestações mais graves da malária estão relacionadas com infecções causadas por *Plasmodium falciparum*, embora ocasionalmente em circunstâncias ainda não esclarecidas, ocorra relato de malária severa e fatal ocasionada por *Plasmodium vivax* (Mendis *et al.*, 2001). A evolução do quadro clínico da malária é observada frequentemente com maior gravidade em crianças na faixa de seis meses a cinco anos de idade, mulheres grávidas e adultos procedentes de áreas não endêmicas (Shingadia & Shulman, 2000; Richie & Sault, 2002; Okoko *et al.*, 2003).

1.2.3 Imunologia da malária

A infecção pelo plasmódio provoca uma intensa estimulação do sistema imune, e desencadeia respostas humoral e celular, que podem ser protetora ou levar a um quadro de malária grave, dependendo da intensidade. Essa resposta na malária é complexa, devido ser espécie-específica e estágio-específica. Assim, a defesa na malária atua contra os esporozoítos, as formas hepáticas e as formas eritrocíticas assexuada e sexuada. A intensidade, duração e qualidade da resposta imune são reguladas por citocinas, que determinam a produção de anticorpos e a ativação de células do sistema fagocitário (Weidanz *et al.*, 1990; Hunt & Grau, 2003).

A resposta imune não oferece proteção total; vários fatores contribuem para esta diminuição da proteção, entre eles, a estrutura complexa do parasito nos diferentes estágios do hospedeiro vertebrado, estimulação de mediadores desfavoráveis à ação de anticorpos, além da localização intracelular do parasito na maior parte do tempo quando no hospedeiro vertebrado (Ferreira-da-Cruz & Daniel-Ribeiro, 1996; Sinnis & Sim, 1997; Gaur *et al.*, 2004). Se a resposta imune fosse efetiva, a imunidade anti-esporozoíto impediria a infecção malárica pela inativação do plasmódio na porta de entrada, enquanto a

imunidade contra as formas eritrocitárias assexuadas impediria o estabelecimento da doença (Ekala *et al.*, 2002).

Citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , INF- γ , IL-1 e IL-6 têm envolvimento significativo na malária. Estudos demonstraram uma elevação no nível de TNF- α em pacientes com malária em associação com esquizogonia do parasito. Também foi relatado que crianças com malária grave têm níveis de TNF- α mais elevados que aquelas com malária não complicada (sem afetar o cérebro) (Malaguarnera & Musumeci, 2002). TNF- α e INF- γ promovem a redistribuição e autoregulação da expressão de moléculas de adesão. Autópsias feitas em cérebro de indivíduos que morreram por malária cerebral mostraram que tiveram um aumento da expressão de ICAM-1 em capilares cerebrais (Kampfl *et al.*, 1997).

Outros estudos ligaram a anemia severa com respostas insuficientes de IL-10 às concentrações elevadas de TNF- α (*apud* Heddini, 2002). Foi relatado que células apresentadoras de antígenos (APCs) induzem linfócitos Th1 a secretarem substâncias imunorreguladoras (como por exemplo, INF- γ e IL-2), responsáveis pela ativação de macrófagos (estímulo principal para a produção de TNF- α e outros mediadores, como óxido nítrico) e diferenciação de células B. Assim, as células T participam da imunidade protetora e agem como células efetoras ou auxiliares (Green *et al.*, 1994; Heddini, 2002; Hunt & Grau, 2003). Algumas citocinas produzidas por linfócito Th1 - TNF- α , INF- γ e linfotoxinas - estão envolvidas no processo imunopatológico da malária cerebral, enquanto que citocinas produzidas por linfócito Th2 - IL-10, TGF- β - possuem funções imunorreguladoras na resposta imune da malária cerebral (Green *et al.*, 1994; Hunt & Grau, 2003).

Dessa forma, a imunidade celular contra *P. falciparum* é mediada por macrófagos e neutrófilos, com ou sem anticorpos específicos; e por citocinas, como TNF- α

e INF- γ , e reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio (Clark *et al.*, 1991). Os linfócitos T citotóxicos também estão envolvidos por atuarem contra as formas hepáticas do plasmódio, direta ou indiretamente, através da produção de INF- γ e ativação de macrófagos (Taylor-Robinson, 1998; Wassmer *et al.*, 2003).

Os estudos envolvendo células T na imunidade aos parasitos da malária humana são muitos complexos e resultam freqüentemente em evidências controversas. Durante a infecção aguda por *P. falciparum*, ocorre um estado de imunodepressão com aumento a susceptibilidade às infecções concomitantes (Troye-Blomberg *et al.*, 1999; Medana *et al.*, 2001; Stevenson *et al.*, 2004).

Apesar de bastante estudada, a participação dos anticorpos na imunidade à malária cerebral ainda não está bem esclarecida e permanece obscuro o mecanismo como eles exercem seu efeito protetor. É descrito que eles inibem a invasão dos eritrócitos, promovem opsonização dos merozoítos e eritrócitos infectados, com facilitação da fagocitose pelos macrófagos (Ahvasi *et al.*, 1995).

Inicialmente foi proposto que o papel dos anticorpos seria neutralizar o parasito, impedindo a penetração de merozoítos no eritrócito. Na última década, foi evidenciado, através de estudos *in vitro*, que anticorpos protetores humanos de indivíduos clinicamente imunes à malária são imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG3. Também foi demonstrado que estes anticorpos podem inibir a multiplicação do parasito não diretamente, mas com envolvimento e a participação de monócitos através do fenômeno denominado ADCI (*Antibody-Dependent Cellular Inhibition*) (Bouharoun-Tayon *et al.*, 1990). Estes anticorpos agem ativando monócitos a secretarem mediadores, dentre os quais o TNF- α em modelos *in vitro*. Dessa forma, estes fatores agem impedindo a multiplicação das formas trofozoítos do *P. falciparum* dentro dos eritrócitos (Bouharoun-Tayon *et al.*, 1995).

1.2.4 Fisiopatologia da malária

Diversos mecanismos parecem envolvidos na fisiopatologia da malária e dependem basicamente, da interação de três fatores: espécie do parasito envolvido, intensidade da parasitemia e imunidade do hospedeiro. As infecções por *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* apresentam parasitemia limitada e a fisiopatologia deve-se à hemólise induzida pelo parasito. Na malária por *Plasmodium falciparum* estão também envolvidos fatores como citoaderência, envolvimento de citocinas e elevada parasitemia (White, 1998; Berendt *et al.*, 1994).

A patogênese da malária é multifatorial e pode estar relacionada com fatores envolvidos entre o hospedeiro e o parasito. Dentre estes fatores, destacamos como desencadeadores dos processos fisiopatológicos a destruição de eritrócitos, causada por esquizogonia, com conseqüente liberação de parasito e restos celulares de eritrócitos na circulação. Ocorre também um aumento na expressão antigênica nos eritrócitos. Estes eventos produzem uma resposta imunológica exacerbada do hospedeiro (Heddini, 2002; Shingadia & Shulman, 2000; Clark & Cowden, 2003). A febre é devido à ruptura do esquizonte hemático e liberação do pigmento malárico e outros antígenos do parasito, em especial o GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol) (Ramasamy, 1998). Este mediador estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-6, INF- γ e TNF- α pelos macrófagos do hospedeiro (Bate *et al.*, 1988; Kwiatkowski *et al.*, 1990; Jaramillo *et al.*, 2004).

O TNF- α figura como um fator importante dentro da patogênese da malária, uma vez que está relacionado com a adesão de eritrócitos nas células endoteliais, que reduz o fluxo de sangue nos vasos (Hunt & Grau, 2003; Hearn *et al.*, 2000), além de alterar a permeabilidade da barreira hemato-encefálica (Treeratanapiboon, 2005). Além do

envolvimento na patogênese da malária, o TNF- α pode ser um fator importante na modulação do parasito, pois esta citocina e febre contribuem para a defesa do hospedeiro, concorrendo para a morte do parasito, reduzindo assim a carga parasitária (Kwiatkowski *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1997; Daniel-Ribeiro & Ferreira-da-Cruz, 2000; Clark & Cowden, 2003). Outras citocinas pró-inflamatórias (como por exemplo, INF- γ) induzem a produção de óxido nítrico, o qual pode interferir na neurotransmissão, além de estar envolvido em vários outros aspectos dentro da infecção malárica (Clark *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1994; Bogdan, 2001; Sobolewski *et al.*, 2005a). Há ainda, evidência de que citocinas podem influenciar vias bioquímicas no cérebro, potencializando a malária cerebral (De Souza & Riley, 2000; Dietrich, 2002; Clark & Cowden, 2003).

As hemácias infectadas pelo *Plasmodium falciparum* possuem a capacidade de aderir às células do endotélio da microcirculação (hipótese conhecida como “seqüestro de eritrócitos”). Esse seqüestro de eritrócitos é causado pela expressão de antígenos do parasito na superfície de eritrócitos infectados e expressão de moléculas de adesão (Berendt *et al.*, 1994; Hearn *et al.*, 2000; Dietrich, 2002). A superfície do eritrócito parasitado é recoberta por protusões denominadas “knobs” (proteínas secretadas pelo parasito e expressas na superfície dos eritrócitos) (Wahlgren *et al.*, 1992; Haldar *et al.*, 2005). Estes “knobs” modificam o metabolismo normal da célula hospedeira, favorecendo a sobrevivência do parasito e sendo crucial para o desenvolvimento da patologia da malária grave, uma vez que aderem às células endoteliais através de moléculas produzidas por elas mesmas, as quais servem de ligantes entre os eritrócitos parasitados e o endotélio (Daniel-Ribeiro & Ferreira-da-Cruz, 2000; Clark & Cowden, 2003; Haldar *et al.*, 2005).

Dentre as principais moléculas de adesão, encontramos as CD36, CD54, molécula de adesão intercelular 1 (intercelular adhesion molecule 1 – ICAM-1), molécula de adesão endotelial (endothelial adhesion molecule 1 – ELAM-1) e molécula de adesão

vascular 1 (vascular adhesion molecule 1 – VCAM-1) (Dietrich, 2002; Wassmer *et al.*, 2003; Cortés *et al.*, 2005). Dessa forma, a adesão dos eritrócitos ao endotélio ou citoaderência, tem importante função na patogenia da doença, comprometendo o fluxo sanguíneo contribuindo para a obstrução de pequenos vasos, desencadeando no bloqueio da condução de oxigênio, podendo gerar um quadro de hipoxia do tecido e acidose láctica. Este é um fenômeno importante, uma vez que a obstrução da microcirculação gera alterações cerebrais (malária cerebral), pulmonares e renais, causam hipoxia e distúrbios metabólicos no hospedeiro (Berendt *et al.*, 1994; Shingadia & Shulman, 2000; Dietrich, 2002; Kirchgatter & Portillo, 2005). Citoaderência designa também a adesão de eritrócitos infectados a eritrócitos não infectados, fenômeno amplamente conhecido como "rosetting" (figura 3), que parece ser o fator potencializador do desenvolvimento patológico da malária (Wahlgren *et al.*, 1994; Dietrich, 2002; Kirchgatter & Portillo, 2005). Esse fenômeno ocorre em consequência da expressão de ligantes parasitários na superfície de eritrócitos infectados bem como receptores do hospedeiro, expressos na superfície dos eritrócitos não infectados (Siebert & Bruck, 2003; Haldar *et al.*, 2005).

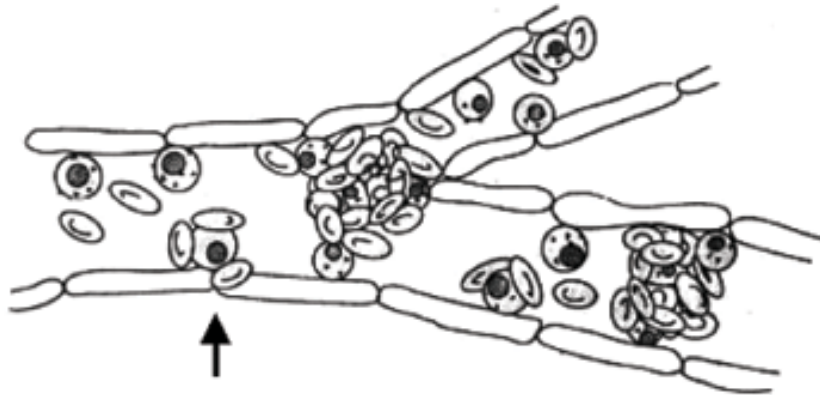


Figura 3: Representação esquemática da citoaderência e do fenômeno “rosetting” que produzem obstrução de vasos. A seta mostra eritrócitos parasitados envolvidos na citoaderência e processo “rosetting”. Fonte: adaptado de Wahlgren *et al.*, 1992.

Na malária grave, a proteína de membrana do eritrócito 1 de *Plasmodium falciparum* (*Plasmodium falciparum-erythrocyte membrane protein 1* –PfEMP1) parece ser o principal ligante adesivo dos eritrócitos infectados. Apesar de vários trabalhos demonstrarem estas interações, uma melhor compreensão da função dos receptores do hospedeiro e dos ligantes do parasito no desenvolvimento da patologia da malária ainda é necessária para um maior esclarecimento de tais processos (Kirchgatter & Portillo, 2005).

Embora o fenômeno da citoaderência esteja envolvido na patogênese da malária grave, essa hipótese sozinha não explica as características da malária cerebral, daí a necessidade de uma outra hipótese, que poderia explicar a resposta exacerbada do sistema imune, onde células T, monócitos, moléculas de adesão e citocinas estão envolvidos nas complicações da malária cerebral (Clark *et al.*, 1991; Medana *et al.*, 2001; Derouich-Guergour, 2001).

Além da ligação entre malária cerebral e os níveis elevados de citocinas (particularmente TNF- α e IL-1 α e β) demonstrada por Bate *et al.* (1988) e posteriormente confirmada por Kwiatkowski *et al.* (1990), observaram também que macrófagos são estimulados a produzir estas citocinas após ruptura do esquizonte. Clark *et al.* (1991) evidenciaram a participação do óxido nítrico e radicais livres de oxigênio, também produzidos por macrófagos e neutrófilos em resposta a essas citocinas. A conjugação desses fenômenos ocasionava lesão celular.

Com base em diversos achados, propôs-se que o NO exerce efeitos tóxicos, por estresse oxidativo (Postma *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2003). Estudos realizados em Papua e Nova Guiné relataram uma falta de associação entre produção de óxido nítrico e níveis de parasitemia (Boutlis *et al.*, 2003; Boutlis *et al.*, 2004). Em outro estudo com crianças na

Tanzânia mostrou que os níveis de nitrito/nitrato no plasma eram mais elevados nas crianças com infecção assintomática e níveis baixos ainda em crianças com malária cerebral (Hobbs *et al.*, 2002). Outros estudos sugeriram um papel protetor para o NO na infecção (Rockett *et al.*, 1991; Brunet, 2001; *apud* Heddini, 2002).

No entanto, com base em todos estes estudos envolvendo citocinas e radicais livres e nos resultados obtidos, ainda não foi possível descobrir a chave da patogênese da malária cerebral (Clark & Cowden, 2003).

1.3 ÓXIDO NÍTRICO

Acreditava-se que óxidos nitrogenados fossem sintetizados exclusivamente por microorganismos em processos de nitrificação e desnitrificação. No entanto, por volta de 1916, foi mostrado que, nos animais, havia mais nitratos em suas excretas urinárias do que presente em sua dieta, sugerindo uma produção endógena de compostos nitrogenados. Muito tempo depois foi demonstrado um aumento de metabólitos desses compostos em períodos de infecção em humanos e em cobaias de laboratório (Dawson & Snyder, 1994).

Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram que o relaxamento vascular induzido por agonistas requeria a presença de um endotélio intacto. Até então, sabia-se a resposta vasodilatadora produzida por vários agentes farmacológicos é mediada por uma substância produzida nas células endoteliais. Isto levou estes pesquisadores a inferir sobre a existência de um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF – *Endothelial Derived Relaxing Factor*). Este fator endógeno parecia agir de forma similar aos nitrovasodilatadores, contribuindo para o aumento da Guanosina Monofosfato Cíclica (GMPc) na musculatura vascular. No final dos anos 80, foi sugerido que o EDRF era o NO, um gás de potente ação vasodilatadora (Ignarro *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1988). Em outro estudo foi comprovado que a vasodilatação do endotélio foi estimulada pela produção de NO a partir da L-arginina (Palmer *et al.*, 1987).

1.3.1 Óxido Nítrico Sintase (NOS)

A NOS é a enzima que, na presença de NADPH (cofator) catalisa a conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO, proporção equimolar (Förstermann *et al.*, 1991; Bredt & Snyder, 1994). Existem três isoformas (ou isoenzimas) de NOS: duas constitutivas, neuronal (nNOS ou NOS I) e endotelial (eNOS ou NOS III), que produzem NO sem a necessidade de novas sínteses protéicas, e sua atividade é regulada pelo complexo cálcio-calmodulina (figura 4A) (Moncada *et al.*, 1991); e a isoforma induzida (iNOS ou NOS II), independente do íon Ca^{2+} e está relacionada a resposta imunológicas. É expressa em macrófagos e ativada após estimulação por citocinas (IL-1, INF- γ e TNF- α) e lipopolissacarídeos (figura 4B) (Förstermann *et al.*, 1994; Green *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-arginil-metil-éster (L-NAME) e são caracterizados como inibidores irreversíveis da atividade da NOS constitutiva (Dwyer *et al.*, 1991). A aminoguanidina (AG) atua como inibidora da forma induzida (Lamber *et al.*, 1992).

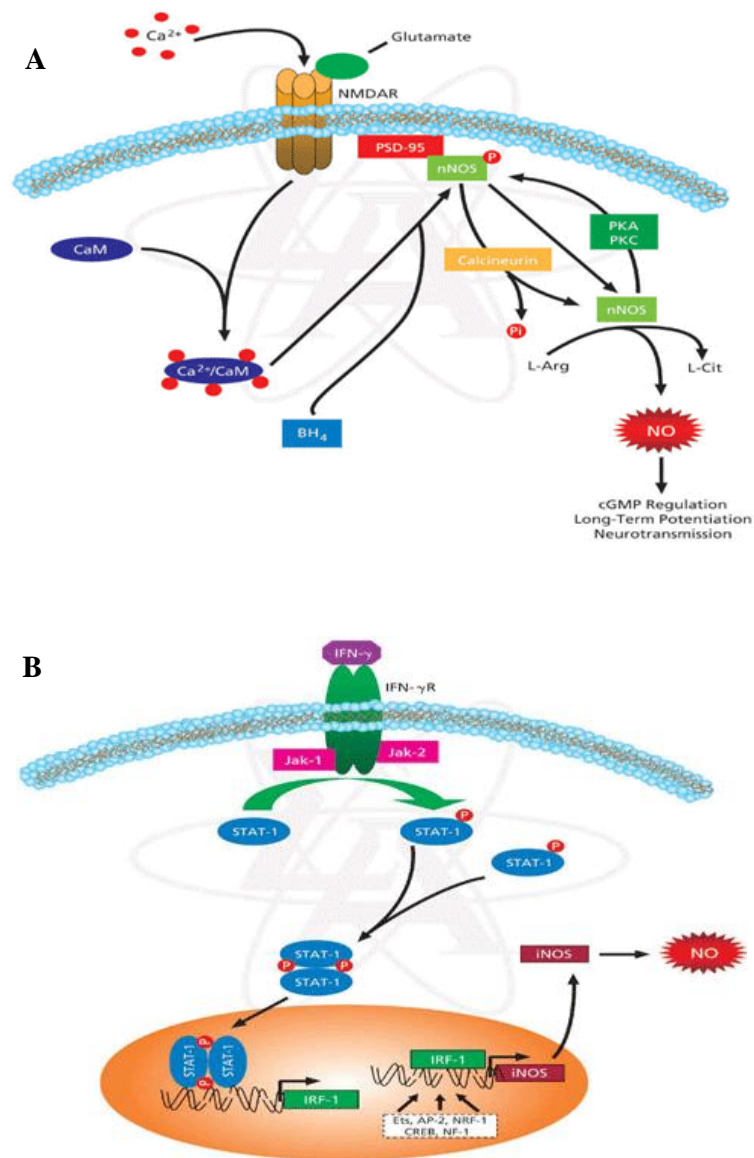


Figura 4. Isoformas da enzima NOS e seus mecanismos de ativação. A – isoforma neuronal da NOS. Fonte: www.sigmaldrich.com/img/assets/6460/mnos.gif. B – isoforma induzida na NOS. Fonte: www.sigmaldrich.com/img/assets/6460/inos.gif.

1.3.2 Fisiologia do NO

O NO é um mediador químico produzido pela maioria dos tipos celulares, atuando de maneira específica, desempenhando diversas funções vitais, dentre ela

neurotransmissão (Förstermann *et al.*, 1995). Muitos efeitos biológicos foram relacionados com a produção do NO. Nos vasos sanguíneos o NO previne a excessiva ativação de plaquetas em resposta a um estímulo agregatório (Moncada *et al.*, 1991). No sistema imune o NO é um componente da resposta imune inata e, quando produzido pela ação da iNOS, é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro por sua ação microbicida devido inibição de enzimas contendo ferro (Clark *et al.*, 1997; Bogdan, 2001), mas também pode apresentar efeitos tóxicos sobre células neoplásicas (Moncada *et al.*, 1991). Em adição, NO derivado da eNOS tem um importante papel na manutenção da homeostasia, por inibir a ativação de células endoteliais e modular a expressão de moléculas de adesão celular (CAMs) (Laroux *et al.*, 2000).

Finalmente, NO possui importante papel tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central. No SNP, o NO produzido pelos neurônios funciona como neurotransmissor, e tem como alvo a musculatura lisa e causa relaxamento. No SNC, ainda não está totalmente esclarecido, embora ele esteja implicado na excitabilidade neuronal, plasticidade sináptica e liberação de neurotransmissores (Prast *et al.*, 2001). Mesmo a nNOS sendo a principal isoforma da produção de NO no SNC, eNOS e iNOS parecem mais envolvidas com as células gliais (Sobolewski *et al.*, 2005a).

A produção bioquímica do NO, pela isoforma nNOS, ocorre após liberação do neurotransmissor glutamato e sua ligação aos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) na membrana pós-sináptica. Esta interação neurotransmissor-receptor provoca a abertura de canais de Ca^{2+} , causando o influxo desse íon (Garthwaite & Boulton, 1995; McCann, 1997). Esse aumento intracelular de Ca^{2+} ativa a nNOS. No sistema imune o NO é produzido após ativação da enzima por um quadro de infecção/inflamação onde células do sistema imune são ativadas por citocinas (Van der Heyde, 2000).

1.3.3 Implicações do NO na malária cerebral

Como relatado anteriormente, várias hipóteses têm sido propostas para o envolvimento do NO durante a patogênese da malária (Clark *et al.*, 1997). NO funciona como um importante mensageiro no SNC, em níveis elevados pode causar neurotoxicidade (Clark & Cowden, 2003). O glutamato liberado em excesso, ativa os receptores NMDA, e pode mediar neurotoxicidade na isquemia, também pode ser ocasionada pela infecção malárica (Dawson *et al.*, 1993; Shinyashiki *et al.*, 1998). NO mostra-se como agente de diferentes ações, as quais são dependentes do local de síntese, da quantidade produzida, do tipo de isoenzima envolvida na sua produção e no microambiente da sua liberação/atuação (Crow & Beckman, 1995; Sobolewski *et al.*, 2005a). Por exemplo, quando pequenas quantidades são liberadas nos terminais nervosos, NO atua como neurotransmissor, e regula desde o relaxamento de esfíncteres no sistema gastrointestinal até a transmissão de estímulos no SNC. NO liberado pelas células endoteliais, regulam o relaxamento da musculatura lisa adjacente e leva a uma vasodilatação. As quantidades maiores produzidas em consequência a uma cadeia de estímulos, envolvendo iNOS, pode ocasionar ou ampliar processos inflamatórios em vários órgãos (Heddini, 2002).

Taylor-Robinson & Smith (1998) demonstraram que o NO produzido por macrófagos possui um papel dicotômico na imunidade, variando entre regulação imune e função efetora imune, e que durante o estágio eritrocítico da malária pode suprimir a resposta linfoproliferativa e matar os parasitos, respectivamente.

Apesar de várias hipóteses correlacionarem o NO com malária cerebral, uma vez que as alterações neurais associam-se a elevados níveis de citocinas levando a geração de NO, na parede celular, pela iNOS (Clark *et al.*, 1991, Ghigo *et al.*, 1995), seu papel dentro desse contexto ainda permanece obscuro. Estudos demonstraram que o desenvolvimento da malária cerebral murina não produz NO, quando Rudin *et al.*, (1997)

observaram que camundongos deficientes de iNOS desenvolviam malária cerebral, sugerindo não ser o NO um fator essencial para o desenvolvimento da malária cerebral. Essa hipótese foi suportada por Favre *et al.* (1999), que obtiveram resultados semelhantes. Por outro lado, outros estudos demonstraram a participação desta molécula moduladora no quadro de malária cerebral (Ghigo *et al.*, 1995; Hobbs *et al.*, 2002).

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

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

Por outro lado, existem diversos estudos em modelos animais que favorecem a hipótese de um aumento na produção de NO e esse poderia mediar a patogênese da malária e ainda ter um efeito antiparasitário (Favre *et al.*, 1999).

Considerando o envolvimento do NO em processos cruciais para o desenvolvimento da patogênese da malária (por exemplo, ativação endotelial, expressão de

CAMs, reposta imune) (figura 5), a necessidade de elucidação dos mecanismos funcionais do NO na malária cerebral torna-se uma importante linha de pesquisa.

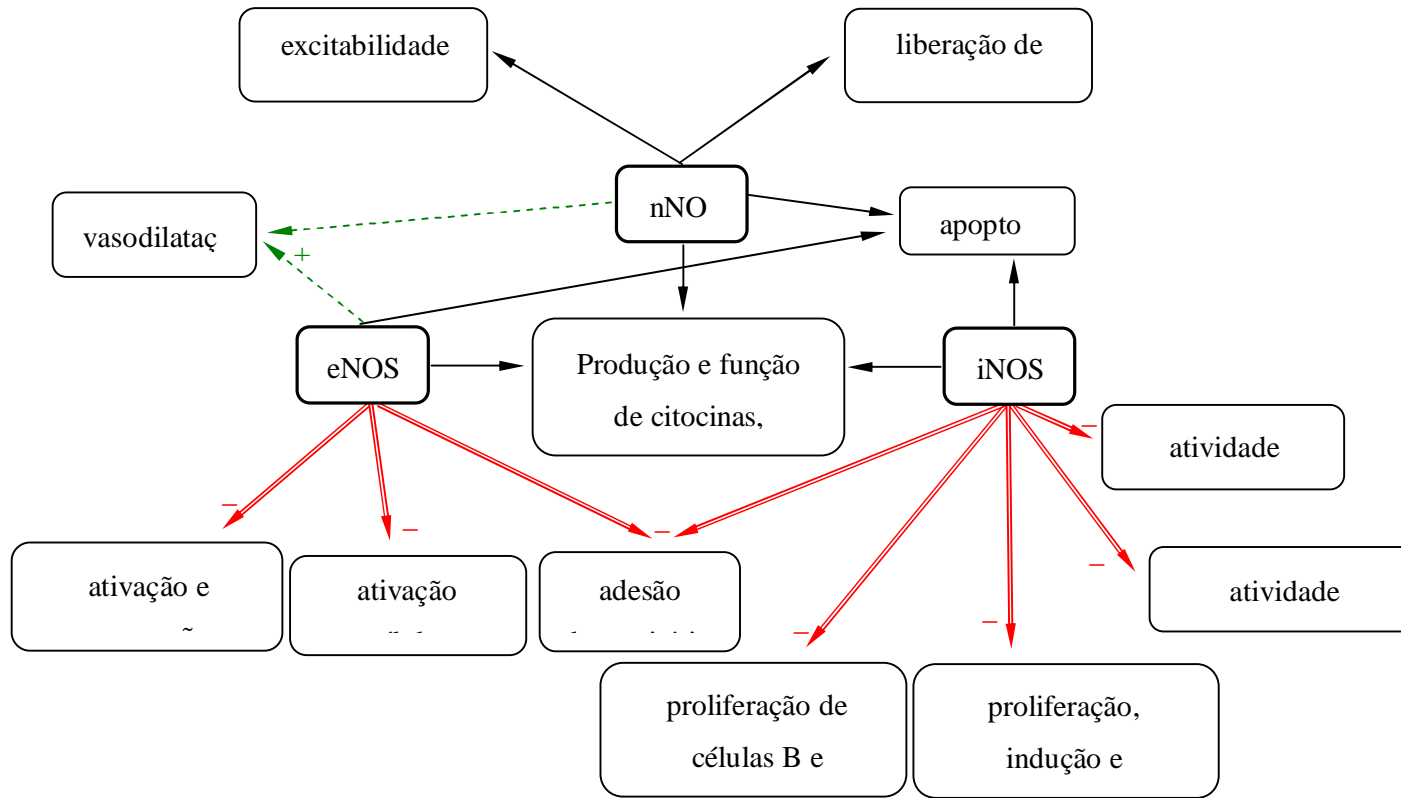


Figura 5. Esquema que demonstra funções fisiológicas do NO que são relevantes dentro da patogênese da malária. De maior importância, vias anti-inflamatória e homeostática (→), que podem ser alteradas pela inibição de NO durante a malária (→) indicam, setas (→) indicam depressão e setas (→) indicam modulação. Fonte: adaptado de Sobolewski *et al.*, 2005a.

1.3 MALÁRIA EM AVES

1.3.1 Considerações gerais

Modelos de malária cerebral têm sido desenvolvidos em macacos, ratos, camundongos, aves, para auxiliar nos estudos acerca da malária humana. Embora nenhum deles seja exatamente igual à malária humana, eles reproduzem alguns aspectos relacionados à patologia e imunologia (De Souza & Riley, 2002; Slater, 2005).

A malária aviária tornou-se conhecida após a descoberta do *Plasmodium gallinaceum*, por Brumpt, em 1935, ao observar esfregaços sanguíneos de galinha. O modelo de malária aviária é bastante interessante pelo fato do *Plasmodium gallinaceum* estar filogeneticamente próximo ao *Plasmodium falciparum*, e desencadear um quadro de malária clínica também semelhante, apresentando sinais e sintomas de malária cerebral. Também em relação aos antígenos e proteínas de superfície, como por exemplo: proteína circumesporozoíta (CS), uma proteína do parasito, que favorece a infecção, apresenta uma 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 CS do *Plasmodium gallinaceum* foi caracterizado e comparado aos domínios funcionais de outros plasmódios e observou-se as mesmas características, incluindo seqüência sinal secretora e regiões centrais repetidas com os aminoácidos. A comparação das seqüências sinais da proteína CS revelou quatro diferentes grupos, tendo o *Plasmodium gallinaceum* proximidade maior ao *Plasmodium falciparum* que causa malária cerebral humana (McCutchan *et al.*, 1996). No entanto, existem diferenças entre as duas espécies, principalmente relacionadas à complexidade do ciclo, como o desenvolvimento inicial do esporozoíto que em mamíferos ocorre nos hepatócitos, e em aves esta fase do ciclo ocorre nos macrófagos e células endoteliais. Na malária aviária ocorre uma fase exoeritrocítica secundária, em consequência da liberação dos merozoítos do primeiro

ciclo exoeritrocítico. Essas formas que invadem novas células teciduais dão continuação 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. O ciclo eritrocítico nas duas espécies está relacionado às manifestações clínicas da doença (Staines *et al.*, 2002).

Outro aspecto importante que ocorre na malária por *Plasmodium falciparum* e que também pode ser observada em modelo experimental murino é o seqüestro de eritrócitos parasitados na microcirculação, diminuindo o transporte de oxigênio, o que desencadeia diversos outros mecanismos envolvidos na infecção (Taylor-Robinson, 2000; Thomas *et al.*, 2001). Até o momento ainda não existem relatos a cerca deste aspecto na malária aviária.

Portanto, considerando que a biologia do *P. gallinaceum* apresenta-se semelhante à do *P. falciparum*, o modelo de malária aviária pode ser um excelente modelo experimental para o entendimento dos mecanismos envolvidos na malária cerebral.

1.3.2 O ciclo de vida do *Plasmodium* em aves

O ciclo completo do parasito é obtido com a infecção de mosquitos, tendo como vetor experimental o mosquito *Aedes fluviatilis* (Krettli, 1994). O ciclo exoeritrocítico da malária aviária, apesar de mais rápido, não difere das espécies que infectam o homem, produzindo um número de merozoítos comparável ao do homem, porém em tempo mais curto.

Ramirez *et al.* (1991) em experimentos *in vitro*, culturas com as formas exoeritrocíticas (esporozoítos) de *Plasmodium gallinaceum*, como hospedeiro macrófagos precursores da medula óssea de galinhas, demonstraram um completo desenvolvimento do parasito no período de 70 h, após o qual, as células sofreram rupturas e os merozoítos livres foram observados. Assim, os dados indicam que macrófagos suportam o desenvolvimento de

esporozoítos de *Plasmodium gallinaceum* e que a circumesporozoíta está presente até o fim do ciclo exoeritrocítico esquizogônico (Ramirez *et al.*, 1991). O ciclo eritrocítico obedece ao mesmo padrão de infecção observado em *Plasmodium falciparum* (Ladda *et al.*, 2001; Staines *et al.*, 2002; Slater, 2005).

1.4 O SISTEMA IMUNE NAS AVES

Os macrófagos são células do sistema fagocitário mononuclear. O desenvolvimento desses fagócitos em aves é semelhante ao observado em mamíferos, onde células troncos da medula óssea produzem monoblastos, Essas células se diferenciam em promócitos e monócitos. Dessa forma, os monócitos migram da circulação periférica para os tecidos, e diferenciam em macrófagos (Lam, 1999). Em modelos de cultura de macrófagos também se observa esta diferenciação (DaMatta, 1998).

Os macrófagos possuem diversas funções, além de sua alta capacidade fagocítica, dentre elas: citotoxicidade celular funcionam como células apresentadoras de antígenos e secretoras de substâncias e como agentes quimiotáticos (Lam, 1999; Urban & Roberts, 2002).

Em aves, os macrófagos residentes apresentam baixa taxa de fagocitose e baixa resposta a citocinas. No entanto, Dil & Qureshi (2003) demonstraram que estes macrófagos podem se tornar ativados (com suas capacidades aumentadas) quando expostos a produtos bacterianos (como LPS) e interferons, mostrando que o INF- γ aumenta a atividade fagocítica e produtora de óxido nítrico.

A resposta imune, que envolve cooperação celular entre célula apresentadora de antígenos (APC), linfócitos B e linfócitos T, é iniciada por uma estimulação antigênica. As APCs processam e apresentam o antígeno para linfócitos. O linfócito B, principal célula da imunidade humoral, produz anticorpos. Os linfócitos T, importantes na imunidade celular, diferenciam-se funcionalmente em diversas sub-populações, que têm sido fenotipadas com

reagentes monoclonais e são similares aos linfócitos T de mamífero (Sharma, 1991; Vainio & Imhof, 1995).

Mesmo funcionando com os mesmos mecanismos do sistema imune de mamíferos, pouco tem sido descrito sobre as alterações funcionais de macrófagos de aves. Estudos para avaliar fagocitose demonstraram que macrófagos de galinha fagocitam hemácias opsonizadas e não-opsonizadas de forma mais potente quando estão ativados (Qureshi & Miller, 1991).

Considerando os mecanismos efetores da resposta imune relacionado aos macrófagos de aves, foi demonstrado que estas células expressam receptores de superfície para Fc e para C3b, os quais aumentam sua capacidade de fagocitar partículas opsonizadas por imunoglobulinas e componentes do sistema complemento, respectivamente. Assim, como macrófagos de mamíferos, os macrófagos de aves também são capazes de produzir reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio (Dil & Qureshi, 2003).

Este mecanismo é importante, uma vez que, para uma partícula ser fagocitada, ela deve ligar-se à superfície do macrófago. Porém, nem todas as partículas que se ligam são fagocitadas, pois necessitam de receptores que funcionam como ligantes e devem ser ativados para que ocorra fagocitose. Os ativadores mais bem caracterizados são os anticorpos, que se ligam à superfície dos antígenos de forma que a região Fc do anticorpo fique exposta ao exterior, deixando a partícula opsonizada, sendo então, reconhecida por receptores específicos para Fc, nas superfícies dos macrófagos. A ligação de uma partícula à superfície celular não ativa, necessariamente, a internalização da mesma. Assim, macrófagos, e outros fagócitos profissionais, usualmente podem ter muito mais partículas ligadas do que interiorizadas (Bos & De Souza, 2000).

Apesar de todos os conhecimentos a cerca da malária, ainda há uma grande necessidade de melhor compreender os mecanismos celulares e moleculares que participam

da malária cerebral. Para isso, foram estabelecidos alguns modelos experimentais afim de uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença e na resposta imune. O modelo de malária murina causada por *Plasmodium berghei* que causa um quadro de malária cerebral é muito utilizado para a compreensão dos mecanismos da imunopatologia da malária. A busca de novos modelos experimentais é uma alternativa para o entendimento da fisiopatologia desta doença em sua forma mais grave. Assim, o estabelecimento do modelo aviário pode ser de grande interesse para a compreensão destas alterações, aliado ao fato da biologia do *Plasmodium gallinaceum* ser semelhante a do *Plasmodium falciparum*, que em humanos causa malária cerebral. É interessante também que esses diferentes modelos experimentais de malária podem ser comparados e fornecerem pistas importantes para a conhecimento biológico dessa patologia.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estabelecer um modelo experimental de malária cerebral aviária e verificar um possível envolvimento do óxido nítrico na neuropatologia da doença.

2.2 ESPECÍFICOS

- Pesquisar fatores envolvidos no quadro clínico da malária (parasitemia, anemia, temperatura) correlacionando com o grupo controle;
- Descrever alterações macroscópicas dos órgãos de aves dos grupos controle e infectado;
- Descrever o padrão histopatológico no cérebro das aves infectadas e correlacionar com parasitemia e quadro clínico
- Medir a atividade da óxido nítrico sintase (NOS) em cérebros de animais infectados e controles.
- Medir os níveis de nitrito em macrófagos de animais infectados e controles.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CEPA DO PARASITO

Para o modelo experimental, foi utilizado o protozoário *Plasmodium gallinaceum* Brumpt, 1935 (cepa 8A), proveniente do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisa René Rachou (Fundação Oswaldo Cruz/MG).

A manutenção da cepa para este trabalho foi realizada por sucessivas passagens sanguíneas em aves não parasitadas e em seu vetor experimental (*Anopheles darlingi*), de modo a preservar a infectividade do *Plasmodium gallinaceum*.

3.2 AVES

Foram utilizadas aves Leghorn brancas, adquiridas em uma granja local. As aves foram mantidas em gaiolas teladas à temperatura ambiente, com água e ração balanceada *ad libitum*, no biotério da Universidade Federal do Pará.

Utilizamos grupos de aves com 10 dias de idade (estabelecimento do centro termorregulador). Estas foram inoculadas com *Plasmodium gallinaceum* e monitoradas diariamente a partir do 3º dia pós-infecção (período inicial de desenvolvimento do parasito).

As aves foram sacrificadas quando seus eritrócitos apresentavam-se parasitados em diferentes níveis. Como controles foram utilizadas aves não parasitadas. Devido à dificuldade de se obter a mesma parasitemia para repetição de cada experimento, os valores foram aproximados para cada grupo de animais. Assim, para a atividade bioquímica da NOS, utilizamos os seguintes grupos: não infectados, P16%, P30%, P45%, P65% (níveis de parasitemia) e aves na fase crônica da doença; para avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos, foram utilizados os seguintes grupos: não infectados, P0,5%, P25%, P40%, P68% e ainda um grupo de aves com infecção crônica.

3.3 INFECCÃO EXPERIMENTAL

Aos 10 dias de idade, as aves foram distribuídas em dois grupos, controle e infectado. Os eritrócitos parasitados para a infecção experimental foram obtidos de uma ave infectada com parasitemia elevada e densidade total de eritrócitos conhecida, como descrito por Permin & Juhl (2002). O sangue foi diluído com solução fisiológica normal (NaCl 0,9 %) a fim de alcançar a concentração desejada de eritrócitos infectados (10^6 eritrócitos parasitados). Cada ave recebeu um inóculo de 0,1 ml por via endovenosa.

3.4 DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA

A partir do 3º dia pós infecção, a parasitemia foi acompanhada diariamente, a fim de se observar os animais doentes, as características clínicas, monitoramento dos níveis de parasitemia.

As gotas sanguíneas para confecção dos esfregaços foram obtidas das veias das pregas interdigitais, asas ou pernas dos animais. Assim, para controle de parasitemia, as lâminas foram confeccionadas e coradas pelo método de Giemsa. Os esfregaços sanguíneos foram fixados em metanol por aproximadamente 30 segundos, lavados com água destilada e cobertos com o corante diluído (1:20) durante 20 minutos. O excesso de corante foi lavado com água destilada. Após secagem, a lâmina foi observada ao microscópio, e a parasitemia analisada e calculada. O resultado foi expresso em porcentagem de hemácias parasitadas em relação ao controle.

3.5 AVES COM INFECÇÃO CRÔNICA

As aves que conseguiram sobreviver espontaneamente após a fase aguda da infecção, mesmo depois de desenvolver algumas características clínicas foram consideradas como aves em fase crônica, pois apesar de não mostrarem o quadro clínico da doença, essas aves permaneceram com parasitos na circulação, porém em número reduzido.

3.6 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

Todos os animais foram monitorados diariamente a partir do 3º dia pós-infecção, para a observação das características clínicas. Após sacrifício das aves infectadas e não-infectadas usadas no trabalho, foram observadas macroscopicamente as condições de diversos órgãos (fígado, pulmão, baço, rins, coração e intestino).

3.7 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DO HEMATÓCRITO

Os valores de hematócrito foram determinados das amostras de sangue obtidas da veia da asa do animal. As amostras foram colocadas em capilares de vidro e centrifugadas em microcentrífuga para hematócrito, procedimento realizado no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará. O procedimento padrão para obtenção dos valores foi descrito por Williams (1986a).

3.8 OBTENÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL

A temperatura foi avaliada diariamente entre 15:00 e 16:00h, de acordo com o método padronizado por Williams (1986b), no qual consiste na inserção de um termômetro na cloaca da ave e a temperatura estabilizada foi considerada como temperatura do animal.

3.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÉREBRO

Após sacrifício dos animais, os cérebros foram obtidos por craniotomia e fixados em formalina neutra tamponada a 4% para posterior exame histopatológico. As amostras foram processadas segundo técnica de rotina de um laboratório 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, finalmente, inclusão e formação de blocos, que após resfriados foram seccionados utilizando micrótono rotativo. Os cortes de 5µm de espessura foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina.

3.10 ATIVIDADE BIOQUÍMICA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS)

A atividade da NOS foi avaliada de acordo com o protocolo estabelecido por Bredt & Snyder (1990) com algumas modificações. O princípio da técnica baseia-se na capacidade da NOS em converter o aminoácido L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico (NO), em proporção equimolar, processo este dependente de NADPH.

Foram utilizados cérebros obtidos por craniotomia. As amostras dos animais controles, parasitados e crônicos foram homogeneizadas, separadamente, em 2 ml de tampão NOS (constituído por valina 100 mM em tampão HEPES 20 mM; cloreto de cálcio 45 mM; ditioneitol (DTT) e tampão HEPES 100 mM).

O ensaio foi iniciado com a adição de 45 µl de tampão NOS, 25 µl de L-[3H]-Arginina, 50 µl do homogeneizado das amostras, acrescentando 20 µl de calmodulina 200 U/ml e 10 µl de NADPH (co-fatores da reação). As amostras foram feitas em duplicatas, com um volume final de 150 µl em cada tubo. Partindo-se das amostras de animais controles, parasitados e crônicos, também foi utilizado um controle negativo, onde foram adicionados 15 µl de L-nitro-arginina (L-NARG) 45 mM, descrito como inibidor irreversível da atividade enzimática da NOS (Mayer et al., 1993). Dessa forma podemos inferir o real valor da atividade da enzima.

Os tubos foram submetidos a banho-maria a 37°C por 30 minutos. A reação foi finalizada com a adição de 2 ml de tampão gelado (HEPES 20mM; EDTA 2 mM). Devido o

NO ser volátil, a atividade enzimática da NOS pode ser determinada pela quantidade de L-citrulina formada na reação, a qual foi obtida por cromatografia de troca iônica.

3.11 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Em colunas cilíndricas de vidro com 15 cm de comprimento, foram adicionados 2 ml de resina de troca catiônica Dowes-50 (Sigma), pelas quais as amostras foram eluídas.

Sucessivas eluições com água destilada foram feitas com a finalidade de lavar previamente as colunas para retirar o excesso de resina presente. A seguir, as mesmas foram ativadas após eluição de 2 ml de NaOH 1N, seguido de 2 ml de tampão gelado (HEPES 20 mM; EDTA 2 mM), a fim de obter a separação dos íons Na⁺ e OH⁻, que promoveram a retenção da L-[³H]-arginina não convertida na reação. Dessa forma, a L-[³H]-citrulina formada foi coletada em tubos separados, após eluição, para análise por cintilação líquida.

3.12 ANÁLISE POR CINTILAÇÃO LÍQUIDA

Baseada na captação de partículas β emitidas pelo isótopo trício (³H) presente na estrutura da L-[³H]-citrulina formada pela ação da NOS.

Do produto coletado após eluição nas colunas, foi retirada uma alíquota de 200 μ l de cada amostra e colocada em papel filtro de cintilação (retenção >1,5 μ M, Sigma). Após secagem em estufa a 100°C durante 30 minutos, os papéis filtro foram mergulhados em 4 ml de solução de cintilação (0,4% PPO e 0,01% de POPOP em tolueno) que atua como veículo para as partículas β serem captadas pelo cintilador líquido, e levados para análise. Foi feita uma leitura prévia dos tubos contendo líquido de cintilação com finalidade de obter a radiação inicial presente (background).

As partículas radioativas emitidas por cada amostra foram expressas em CPM (contagem por minuto), que está diretamente relacionada com a quantidade de L-[³H]-

citrulina em cada amostra. Os valores obtidos foram diminuídos dos valores observados no background, obtendo assim a CPM real da quantidade de L-[³H]-citrulina formada em cada amostra. Após correção com a quantidade de proteína presente nas amostras, os resultados foram expressos em fmoles de citrulina/ mg de proteína/ minuto.

3.13 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

A dosagem de proteína total de cada amostra foi realizada com a finalidade de correlacionar os níveis de proteínas presentes na amostra com a atividade da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS). O método utilizado foi o descrito por Lowry (1951).

3.14 CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE AVES

Para obtenção da cultura de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico das aves dos grupos controle e infectado, em diferentes parasitemias, utilizamos o protocolo descrito por DaMatta *et al.* (1998). Foram coletadas, por punção cardíaca, amostras de 3 ml de sangue das aves. As amostras foram diluídas, na proporção 1:1, em meio DMEM sem soro (Dulbecco's Modified Eagles Medium – Sigma).

Para obtenção dos diferentes tipos celulares, as amostras foram passadas em um gradiente de concentração com densidade conhecida (Histopaque - Sigma), onde foram centrifugadas a 600 g, 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 gelado (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 gelado. Após contagem em câmara de Neubauer e a concentração para plaqueamento ajustada para 2×10^7 células/ml, as células (150 µl) foram semeadas em placas de 24 poços. Após 1h em estufa a 37 °C e

atmosfera 5 % de CO₂ as células foram lavadas com DMEM sem soro para remoção dos linfócitos (células não-aderentes) e adicionado DMEM suplementado com 10% FBS (Soro Fetal Bovino) para o cultivo dos monócitos. As culturas são lavadas após 24h e 72h com solução de Hank.

3.15 OBTENÇÃO DE INTERFERON- γ DE GALINHA

O INF- γ foi obtido através da cultura de células do baço, linfócitos, com concanavalina A. Após o sacrifício do animal o baço foi retirado e macerado em meio DMEM sem soro contendo antibiótico. O processo foi feito em gelo. Após uma centrifugação a 500g 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e as células foram submetidas a um tampão de lise com a finalidade de eliminar as hemácias. As células foram lavadas duas vezes e cultivadas em garrafas com meio DMEM suplementado com 10% FBS, e concanavalina A na concentração de 15 μ g/ml. Após 48h a 37°C e atmosfera 5% de CO₂, as células foram centrifugadas (500g, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante estocado a -20°C para posterior ativação dos macrófagos.

3.16 CULTIVO E ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Os monócitos das aves dos grupos controle e infectado foram serão cultivados durante quatro dias em DMEM 10% FBS, em estufa de CO₂ para obtenção dos macrófagos (DaMatta *et al.*, 1998). A ativação dos macrófagos foi feita no quarto dia de cultivo, com 1mg/ml de LPS e meio condicionado de culturas de baço de aves saudáveis nas concentrações de 25% e 50 %, nos intervalos de tempo de 24 h e 48 h, após os quais, o meio foi retirado das placas de cultura, centrifugado e o sobrenadante foi separado para análise da produção de óxido nítrico, inferida através da medição dos níveis de seu metabólito nitrito.

3.17 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS

A produção de óxido nítrico foi avaliada através da quantificação de seu metabólito nitrito, utilizando-se o método do Reagente de Griess (Green *et al.*, 1982). A quantificação de óxido nítrico foi feita após leitura do sobrenadante das placas de culturas de macrófagos de aves dos grupos controle e infectado, ativados e não ativados após 24h e 48 h de cultivo. Após centrifugação a 13000 rpm por 1 minuto, 100 μ l da amostra foi colocada em uma placa de 96 poços, onde foi acrescentado 100 μ l do reagente de Griess (descrito anteriormente). Após 10 minutos de reação, as amostras foram submetidas ao leitor de ELISA com comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de nitrito nas amostras foram determinadas através do fator obtido da curva padrão com diluições seriadas de nitrito de sódio a concentrações conhecidas.

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o BioEstat, um programa estatístico com aplicações nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas (Ayres *et al.*) e foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$ em todos os testes aplicados (teste *t* e ANOVA).

4 RESULTADOS

4.1 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

As observações feitas mostram que nos primeiros 4 dias após administração do inóculo contendo *Plasmodium gallinaceum*, os animais comportaram-se como o grupo controle. As observações dos animais controles e infectados foram feitas no período de 10 dias pós-infecção. A partir do 4º dia pós-infecção, os animais começaram a apresentar algumas formas parasitárias na corrente sanguínea. O nível de parasitemia, expresso em percentagens de eritrócitos parasitados em relação ao controle, foi monitorado diariamente. Entre os dias 5 e 7 pós-infecção, os animais apresentaram as primeiras manifestações clínicas da doença, as quais se tornaram mais intensas e freqüentes conforme o aumento da parasitemia. Durante esse período em decorrência do avanço das manifestações clínicas a maioria dos animais infectados morreu, enquanto que apenas alguns sobreviveram. Ao final desta etapa, todos os animais foram sacrificados para realização dos experimentos.

As manifestações clínicas encontradas com maior freqüência dentre os animais infectados foram falta de apetite, anemia, febre (aumento da temperatura), manifestações estas observadas em todos os animais infectados, com maior intensidade nos animais com níveis mais elevados de parasitemia. Além das manifestações clínicas mais comuns, algumas aves apresentaram alteração no sistema locomotor, provavelmente devido a uma protuberância na região dorsal do animal e faziam com que essas ficassem assentadas no fundo da gaiola. Essas manifestações foram encontradas em aves com níveis de parasitemia $\geq 30\%$. Pela inspeção visual foi também observado um quadro de paralisia superficial de membros, presente nas aves com parasitemia $\geq 50\%$, com penas e penugens eriçadas e olhos cerrados, com as cabeças prostradas para baixo. Dentre as manifestações clínicas mais freqüentes observadas em todas as aves que apresentavam o plasmodium no sangue, destaca-se palidez nas cristas e

pernas, com maior intensidade nas aves com níveis mais altos de parasitemia. As aves que desenvolveram parasitemia $\geq 60\%$ apresentaram ataques convulsivos e logo depois morriam.

As aves com infecção crônica começaram a recuperar seu comportamento normal entre os dias 8-9 pós-infecção, fato relacionado à regressão da parasitemia. Apesar desta diminuição, foi observado que as cristas e os pés permaneceram muito pálidos. Entre os dias 10 e 11 pós-infecção, os animais recobram o comportamento normal (comparado ao grupo controle) e a cor normal das cristas e pés foi recuperada na grande maioria a partir do 12º dia pós-infecção.

Durante a infecção com *P. gallinaceum*, os animais apresentavam as fezes de aspecto esverdeadas. Esta característica foi observada a partir do 5º dia pós-infecção. As fezes com características anormais foi dividida em duas fases, fase I, por uma diarreia com aspecto verde e brilhante, que durou aproximadamente 2 dias. Os animais com as características clínicas da doença morreram durante o período da fase I ou, mais raramente, logo após o início da fase II. A fase II foi observada somente nos animais que sobreviveram; as fezes mostravam-se mais consistentes e com coloração de aspecto esverdeada. As fezes voltaram ao normal quando os níveis de parasitemia estavam muito baixos (0,5 a 1%) ou não detectáveis, e o valor do hematócrito estava normal ou perto do normal (comparado com o grupo controle).

4.2 MORTALIDADE

A taxa de mortalidade resultante da injeção intra-venosa de 10^6 eritrócitos parasitados com *Plasmodium gallinaceum* foi avaliada em pequenos grupos de animais, totalizando n=70, em um período de 12 dias pós-infecção. Nossos resultados apontam uma variação entre 75% e 93% nos diferentes experimentos, com uma média de 80% (n=56) de mortalidade do total de animais infectados (figura 6A). Grupos de animais não infectados (n=30) foram monitorados e observamos 100% de sobrevivência. Na figura 6B, demonstramos a percentagem de mortalidade entre os dias 5-10 pós infecção; o maior número de mortes foi observado a partir do 7º dia e após o 10º dia pós-infecção não observamos mais morte devido à uma regressão na parasitemia e patologia da doença.

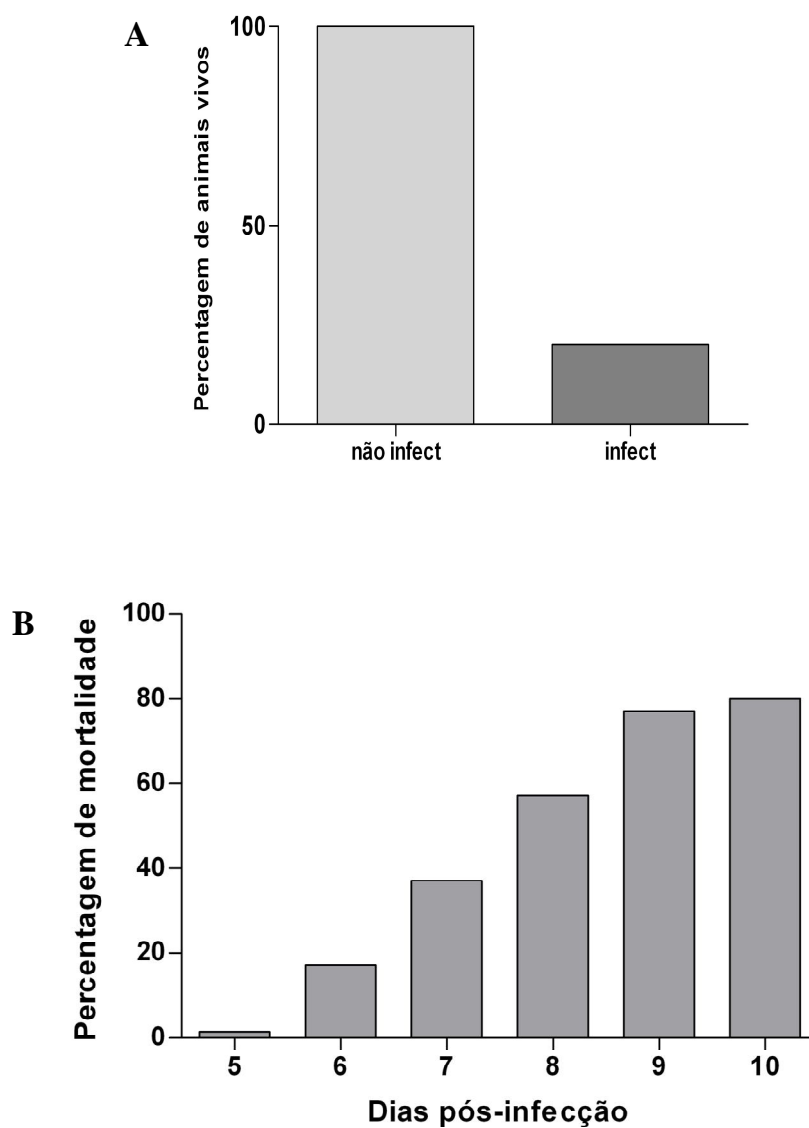


Figura 6. Taxa de mortalidade em animais infectados com *Plasmodium gallinaceum*. Em **A** está representado o percentual de sobrevivência dos animais infectados em relação ao grupo controle. Em **B** está representado o padrão de mortalidade em função dos dias de acompanhamento pós-infecção.

4.3 PARASITEMIA

O período de desenvolvimento do parasito na ave é entre 3-4 dias pós-infecção, após esse periodo encontramos algumas formas parasitárias no sangue. Simultâneo ao aparecimento dessas formas surgem as primeiras manifestações da doença. Com o desenvolvimento do parasito, as formas tornam-se mais frequentes no sangue. Nossos resultados demonstram uma relação direta entre níveis elevados de parasitemia e morte do animal. Nos animais que sobreviveram, o pico de parasitemia ocorreu entre os dias 5-7 pós-infecção. A média do pico de parasitemia entre os animais que desenvolveram a infecção crônica foi de $15,2\% \pm 4,7$ e variou entre 8,4 e 21%. Nesses animais, a parasitemia foi reduzida para aproximadamente 0,5% ao final de 14 dias pós-infecção.

Em todos os animais que desenvolveram a doença, o nível máximo de parasitemia ocorreu no dia da morte. A média da parasitemia que produzia morte nesses animais foi de $57,04\% \pm 15,72$ e variou entre 27 e 83%, com maior número de mortes com parasitemias $>55\%$.

Conforme a parasitemia aumentava, se observava um certo “enfraquecimento” do animal, com conseqüente aparecimento das manifestações clínicas. Alguns animais com parasitemia positiva de aproximadamente 21% e com sintomas mais brandos da doença tiveram uma regressão da parasitemia, o que sugere uma resposta imunológica satisfatória contra o parasito.

4.4 VALORES DE HEMATÓCRITO

Para análise comparativa dos valores de hematócrito, foram utilizados 5 animais não infectados e 30 animais infectados, mantidos em condições semelhantes. Baseado nos resultados obtidos dos controles não infectados e de acordo com Williams (1986b), o valor normal do hematócrito foi estabelecido entre os valores 27% e 32%. A figura 7 mostra a correlação entre os valores do hematócrito e os níveis de parasitemia obtidos no dia da morte do animal. Nos animais que desenvolveram parasitemia alta e manifestações da doença observamos uma diminuição progressiva dos valores de hematócrito, demonstrando assim um alto grau de anemia em decorrência do grande número de hemácias parasitadas. Nos animais que desenvolveram a doença a média dos valores de hematócritos observados no dia da morte foi de $20,3\% \pm 2,62$ (com mínimo de 14% e máximo de 24% nos animais cuja parasitemia de morte foi inferior a 50%). Maiores níveis de parasitemia mostraram menores valores de hematócrito. Os animais não infectados apresentaram uma média de 31,6% e os animais com infecção crônica, $28,2\% \pm 1,16$, valores obtidos no 12º dia pós-infecção.

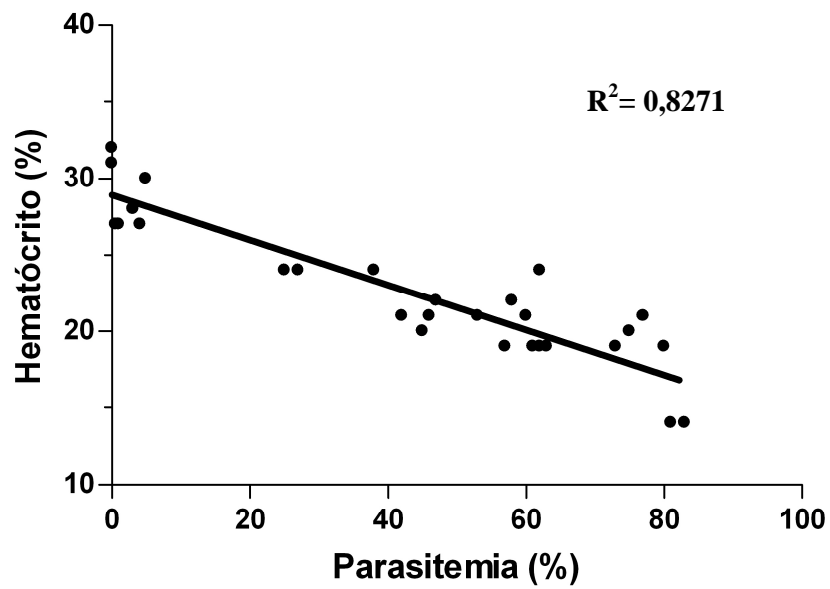


Figura 7. Correlação entre os valores de hematócrito e os níveis de parasitemia dos animais analisados. Como comparação, valores obtidos de animais não infectados e animais com infecção crônica, 12 dias após infecção.

4.5 TEMPERATURA

A figura 8 mostra a temperatura de 22 animais infectados, obtida no dia da morte, ou seja, do maior nível de parasitemia alcançado pelo animal. Para comparação, 10 animais controles foram analisados para estabelecer a temperatura normal sob as mesmas condições de vida. Baseado nestes achados, a temperatura foi definida variando entre 41.1°C e 42°C , dependendo da temperatura ambiente (William, 1986b).

Em todas as aves infectadas e que desenvolveram a doença, observamos uma resposta febril, caracterizada por temperatura $\geq 42^{\circ}\text{C}$. Na maioria dos animais que morreram (cerca de 60%) a variação da temperatura foi observada a partir do 3º dia pós-infecção, e seus valores mais altos ocorreram em animais cuja parasitemia estava elevada. A média dentro desses animais foi $42,6^{\circ}\text{C} \pm 0,38$, com mínimo de $41,9^{\circ}\text{C}$ e valor máximo encontrado de $43,3^{\circ}\text{C}$.

Nos animais com infecção crônica (n=6) observamos uma diminuição da temperatura de acordo com o desaparecimento das formas parasitárias no sangue. Esses animais desenvolveram temperaturas de até $42,3^{\circ}\text{C}$, com média final, adquirida ao final de 14 dias pós-infecção, de $41,4^{\circ}\text{C} \pm 0,32$ (intervalo entre $41,1^{\circ}\text{C}$ e $41,8^{\circ}\text{C}$).

4.6 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS DOS ÓRGÃOS

O resultado da análise macroscópica dos órgãos está apresentada na Figura 9. Uma tendência geral para a cor dos órgãos tornar-se mais escura foi observada com o aumento da parasitemia e o desenvolvimento da doença.

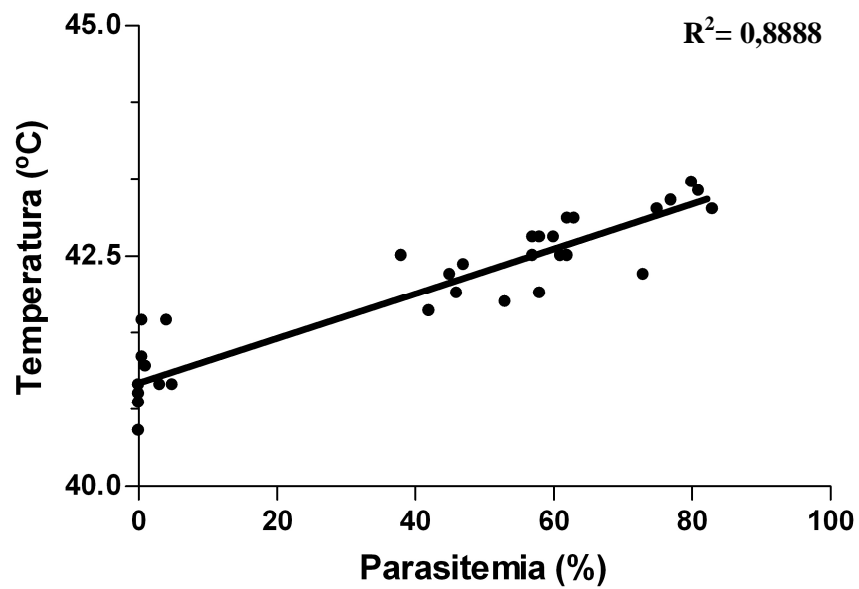


Figura 8. Correlação entre os valores da temperatura dos animais e os níveis de parasitemia dos animais analisados. Como comparação, valores obtidos de animais não infectados e animais com infecção crônica, 12 dias após infecção.

ANIMAIS	ACHADOS MACROSCÓPICOS	ANIMAIS	ACHADOS MACROSCÓPICOS
Não infectado (controle)	Fígado: vermelho profundo Pulmão: rosa brilhante Baço: marrom avermelhado Rins: marrom escuro e liso Coração: vermelho profundo Intestino: conteúdo pálido ou marrom amarelado	Infectado (0,5%)	Igual ao controle
Infectado (5%)	Fígado: ligeiramente inchado, pálido Pulmão: normal Baço: vermelho inchado Rins: ligeiramente inchado Coração: vermelho profundo Intestino: conteúdo verde	Infectado (15%)	Fígado: bastante inchado, marrom pálido Pulmão: marrom pálido Baço: inchado, cinza Rins: ligeiramente inchado Coração: presença de exsudato Intestino: conteúdo verde
Infectado (35%)	Fígado: bastante inchado, marrom chocolate Pulmão: marrom pálido Baço: inchado, cinza Rins: bastante inchado Coração: presença de exsudato Intestino: conteúdo verde	Infectado (50%)	Fígado: bastante inchado, marrom chocolate Pulmão: marrom escuro Baço: bastante inchado, cinza Rins: bastante inchado Coração: presença de exsudato Intestino: conteúdo verde
Infectado (65%)	Fígado: extremamente inchado, marrom escuro Pulmão: marrom escuro Baço: bastante inchado, cinza Rins: bastante inchado Coração: presença de exsudato Intestino: conteúdo verde	Infectado (80%)	Fígado: extremamente inchado, marrom escuro Pulmão: marrom escuro Baço: bastante inchado, cinza Rins: bastante inchado Coração: presença de exsudato Intestino: conteúdo verde

Figura 9. Condições macroscópicas dos órgãos de aves controles e infectadas com *Plasmodium gallinaceum* (n=3 para cada grupo estudado).

4.7 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS CÉREBROS DE AVES INFECTADAS COM *Plasmodium gallinaceum*

Os resultados observados nas secções histológicas de tecido nervoso demonstram edema que por vezes confere um aspecto esponjiforme ao parênquima cerebral, em meio a múltiplos vasos congestos, freqüentemente ocluídos por hemácias que, aparentemente, estão aderidas a parede vascular. O parênquima cerebral em áreas bem circunscritas apresenta gliose e por vezes hemorragia focal. Há presença de vacuolização perineuronal, associada a neurônios que, ora mostram aspecto reativo, ora apresentam retração e eosinofilia com núcleos picnóticos (aspecto apoptótico). As membranas meníngeas encontram-se espessadas a custa de congestão e infiltrado inflamatório linfomononuclear e os vasos meníngeos freqüentemente mostram luz ocluída pelo acúmulo de eritrócitos sanguíneos que aparentemente se aderem à parede vascular. Em algumas secções encontramos pigmento sugestivo de pigmento malárico (figura 12D), característica peculiar de encefalite malárica.

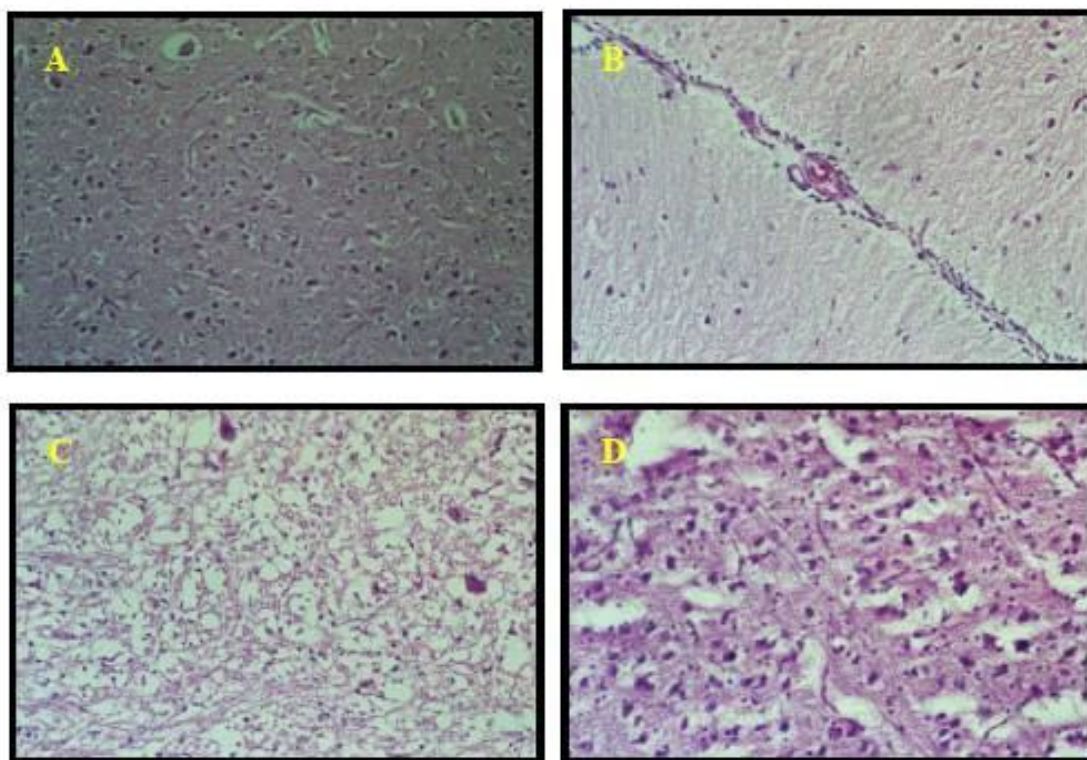


Figura 10. Secções de tecido cerebral de aves infectadas pelo *P. gallinaceum* coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina. A figura **A** representa um tecido cerebral normal (200x). Em **B** observa-se secção de tecido cerebral com leve aspecto espongíótico associado a infiltrado discreto de linfomononucleares e congestão vascular característica (200x). Em **C**, tecido cerebral mostrando intenso aspecto espongíótico com infiltrado inflamatório de linfomononucleares associado (200x). Em **D**, há presença de infiltrado de linfomononucleares moderado, associado a aspecto espongíótico do tecido cerebral (400x).

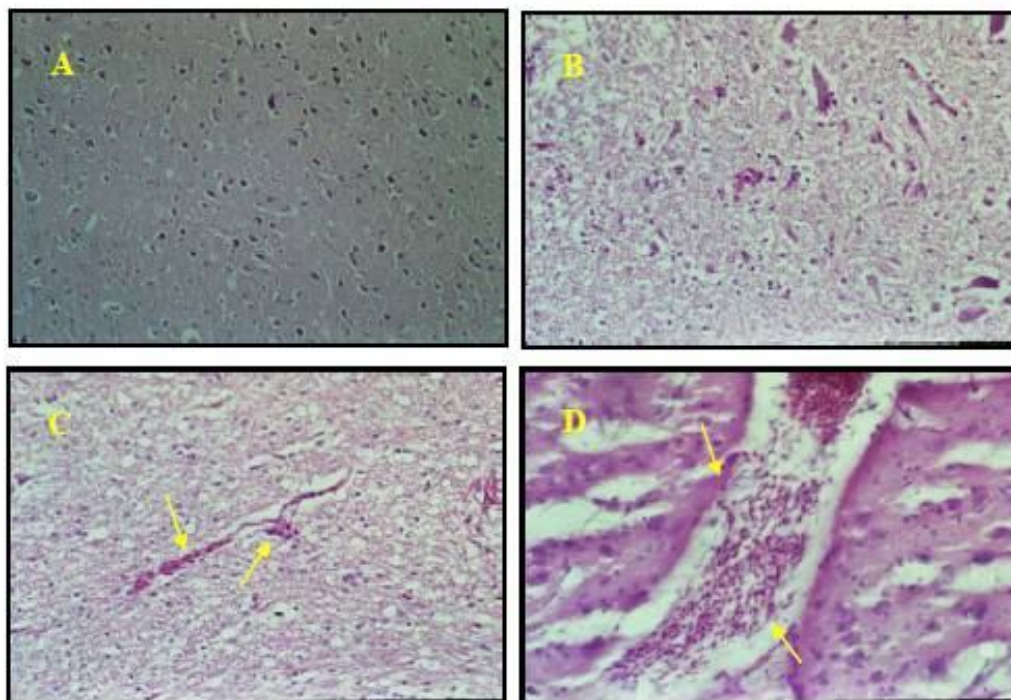


Figura 11. Secções de tecido cerebral de aves infectadas pelo *P. gallinaceum* coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina. A figura **A** mostra um tecido cerebral normal (200x). Em **B**, presença de infiltrado inflamatório moderado permeando tecido neural com aspecto espongiótico (400x). Em **C** observa-se congestão vascular com marginação de hemácias e aspecto espongiótico do tecido neural (200x). Em **D**, congestão vascular característica associada a moderado edema de parênquima cerebral (400x).

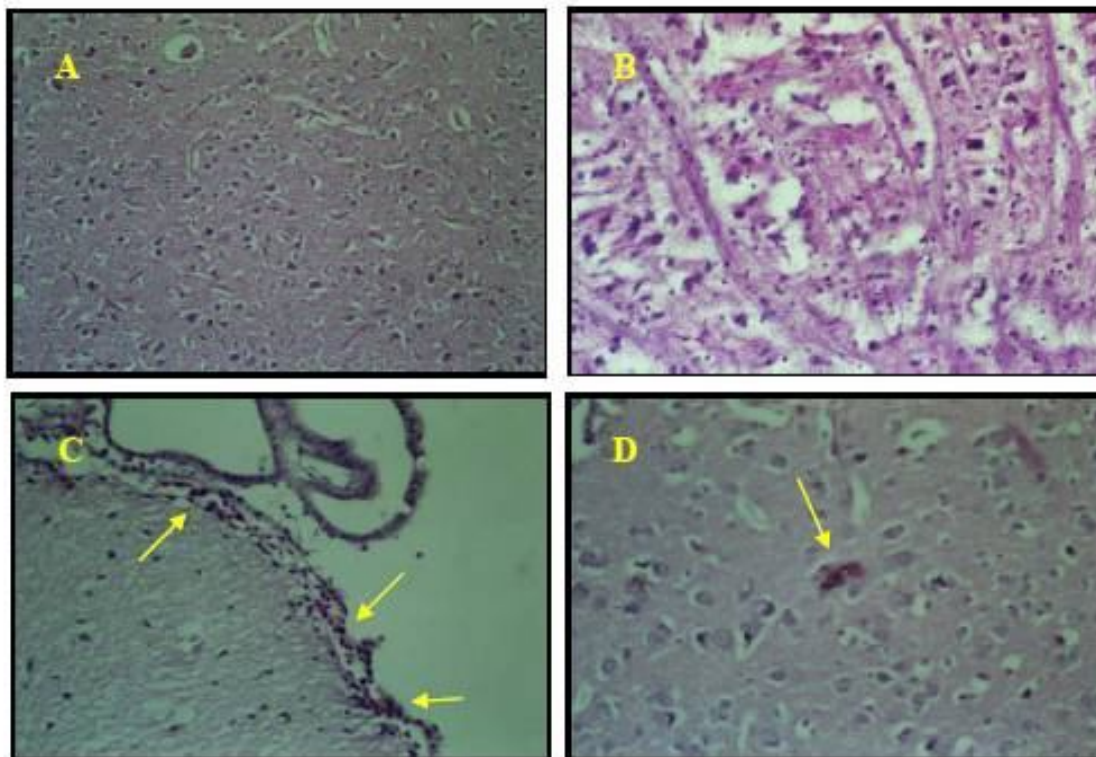


Figura 12. Secções de tecido cerebral de aves infectadas pelo *P. gallinaceum* coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina. Na figura **A**, tecido cerebral normal (200x). Em **B**, presença de infiltrado de linfomononucleares moderado associado a edema, e moderado aspecto espongíótico do parênquima cerebral (400x). Em **C**, observa-se meninges mostrando congestão vascular característica (200x). Em **D**, secção de parênquima cerebral mostrando área focal com depósito de material acastanhado, sugestivo de pigmento malárico, em meio a moderada gliose e vacuolização do parênquima neural (400x).

4.8 ATIVIDADE DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE EM CÉREBROS DE ANIMAIS INFECTADOS COM *Plasmodium gallinaceum*

Em nossos experimentos para avaliar a atividade bioquímica da Óxido Nítrico Sintase, utilizamos grupos de aves não-infectadas e infectadas. As aves infectadas foram divididas em grupos com parasitemias semelhantes e ainda um grupo com infecção crônica.

O padrão bioquímico da atividade da NOS foi comparado entre os animais infectados, não infectados e com infecção crônica. A atividade da enzima está diminuída em todos os grupos de animais infectados, independente do nível de parasitemia, quando comparado a atividade do controle não infectado. A atividade da NOS no grupo controle foi de 10,8 fmoles de citrulina/mg proteína/min. Os animais infectados foram divididos em grupos conforme a parasitemia. Dessa forma, obtivemos grupos com parasitemias de P16%, no qual a atividade da NOS foi 1,5 fmoles de citrulina/mg proteína/min, P30% com 3,1 fmoles de citrulina/mg proteína/min, P45% 4,3 fmoles de citrulina/mg proteína/min e P65% 10,3 fmoles de citrulina/mg proteína/min. Apesar dos animais infectados mostrarem uma diminuição significativa na atividade enzimática, verificamos que conforme ocorre aumento da parasitemia, a atividade enzimática da NOS se mostra mais elevada nestes animais (figura 13A). No grupo P65%, encontramos atividade semelhante ao encontrado nos animais do grupo controle, o que pode implicar no envolvimento do neurotransmissor óxido nítrico no desenvolvimento da malária cerebral.

A atividade da enzima nos animais com parasitemia 16%, está diminuída cerca de 86% quando comparada aos animais do grupo controle. Também observamos diferença na atividade da enzima quando comparamos os animais P16%, P30% e P45% com os animais P65%, onde estes animais apresentam um aumento de cerca de 85%, 69% e 58%, respectivamente, em relação aos grupos de animais com parasitemias menores.

Nossos resultados demonstram um aumento de cerca de 27% na atividade da NOS entre os animais com P30% e P45%, no entanto não há diferença significativa entre eles, mostrando que não houve aumento da atividade da enzima nestes grupos.

Os animais na fase crônica da doença mostraram uma diminuição de aproximadamente 65% em relação ao grupo controle, com atividade de 4,3 fmoles de citrulina/mgptn/min (figura 13B).

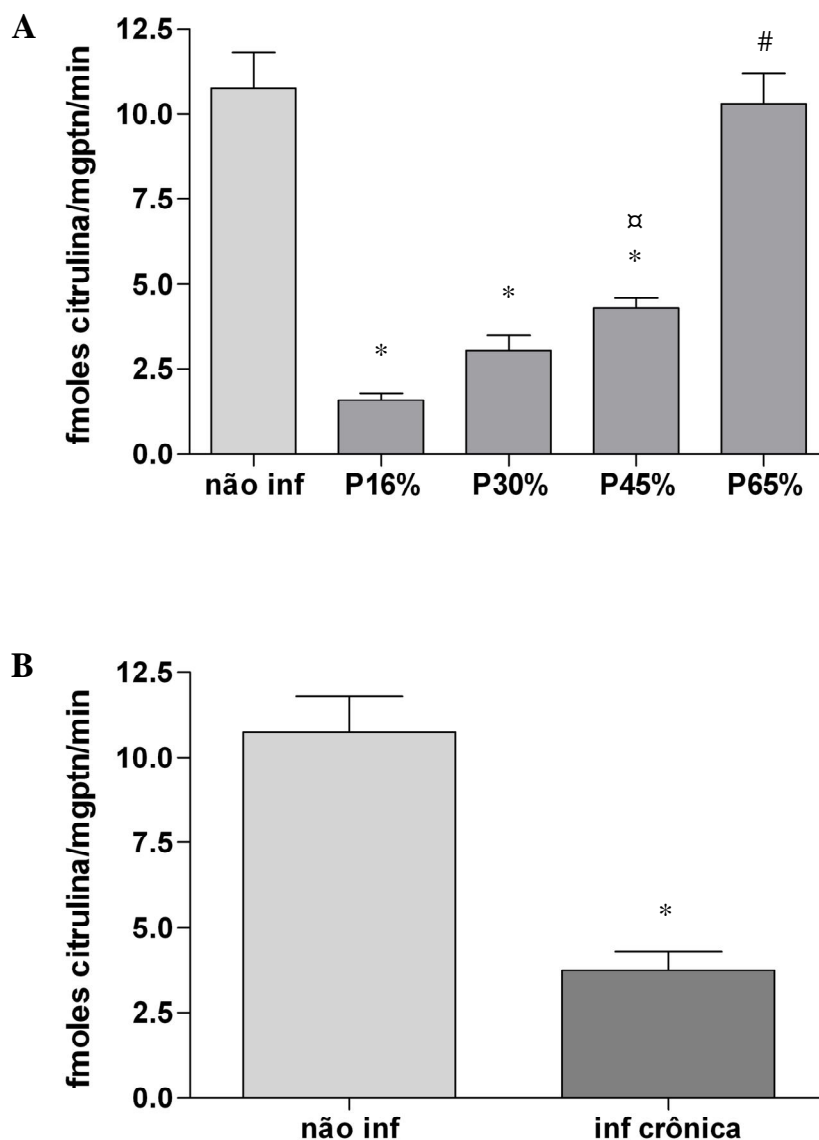


Figura 13: Atividade da NOS em cérebro de animais não infectados e infectados com *Plasmodium gallinaceum*. Em A está expresso a atividade da enzima em animais não infectados e infectados em diferentes níveis de parasitemia. * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo P16%, P30% e P45%; ‡ $p < 0,05$ em relação ao grupo P16%. O gráfico B mostra a atividade da enzima em animais não infectados e animais com infecção crônica. * $p < 0,05$ (ANOVA, teste *t*). Os cérebros foram obtidos no período de 5 a 14 dias após infecção.

4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Após investigar a atividade da NOS em cérebros, analisamos a produção de nitrito em macrófagos como um sub produto da ativação peça isoforma induzida da NOS. Macrófagos quando estimulados por LPS e meio condicionado de células de baço (INF- γ) têm a produção de NO aumentada. Dessa forma, analisamos a produção por macrófagos tratados e não-tratados de cada grupo estudado (não infectado e infectados na fase aguda com diferentes parasitemias). Avaliamos ainda um grupo de animais com infecção crônica.

Os valores de nitrito obtidos no grupo controle foram 3,4 e 7,4 μM nos macrófagos tratados com LPS e INF- γ (meio condicionado), respectivamente, com um aumento de 120% (figura 14A). Quando analisamos os macrófagos tratados dos demais grupos com parasitemias de 0,5%, 25%, 40% e 68%, encontramos aumentos de 12,8%, 17,8%, 19,2% e 15,2%, respectivamente, em relação aos macrófagos sem tratamento com LPS. A produção de nitrito foi diretamente proporcional ao aumento da parasitemia, o que sugere um aumento na atividade da enzima iNOS em consequência ao quadro de infecção. Dessa forma, os valores encontrados foram 3,4 μM , 3,6 μM , 10,7 μM , 14,6 μM e 19,7 μM , nos grupos não infectado e 0,5%, 25%, 40% e 68% de parasitemia, mostrando aumento, comparado ao controle, de 6,5%, 217%, 335% e 485%, respectivamente (figura 14A).

A figura 14B mostra a produção de nitrito entre as parasitemias 0,5% (infecção crônica) e os animais não infectados. Observamos a produção de 7,9 μM de nitrito com aumento de 133% comparado ao grupo não infectado (3,4 μM de nitrito). A atividade da enzima está aumentada em todos os grupos de animais infectados, independente do nível de parasitemia, quando comparados a atividade do controle não infectado, sugerindo fortemente a participação do NO produzido pela iNOS, no processo imunológico resultante da infecção malárica.

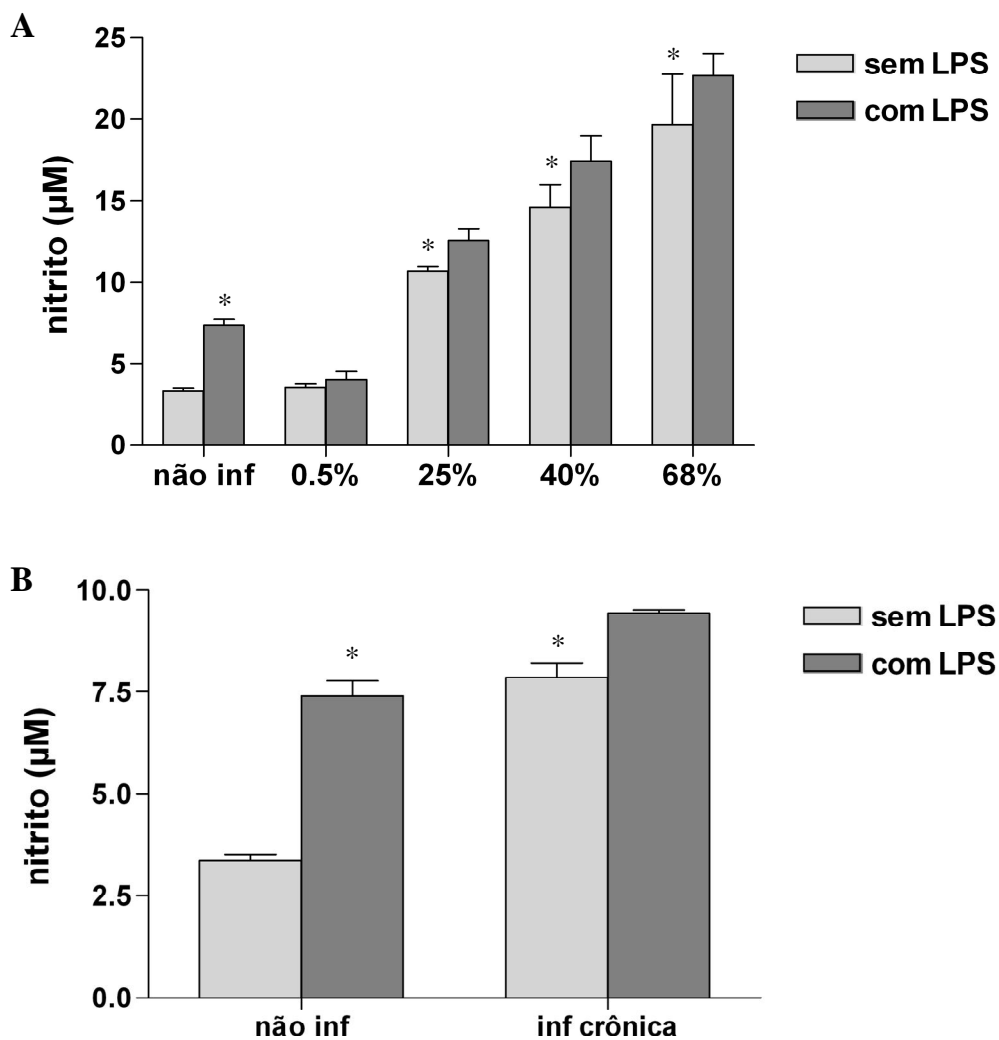


Figura 14. Produção de óxido nítrico por macrófagos derivados de monócitos de animais com infecção por *Plasmodium gallinaceum*. Em A está expresso a produção de óxido nítrico em animais não infectados e infectados em diferentes níveis de parasitemia. * $p < 0,05$ em relação ao controle sem LPS. O gráfico B mostra a produção por macrófagos de animais não infectados e animais com infecção crônica. * $p < 0,05$ em relação ao controle sem LPS (ANOVA, teste *t*). Culturas obtidas no período de 5 a 14 dias após infecção.

5 DISCUSSÃO

A fisiopatologia da malária é bastante complexa apesar de vários estudos realizados e acúmulos de dados, muitos aspectos envolvidos no desenvolvimento da doença ainda necessitam de esclarecimentos. Nesse contexto, diversos modelos de estudos em malária vêm sendo desenvolvidos. Por esse motivo, modelos de malária experimental têm sido desenvolvidos em macacos, ratos e camundongos, e embora nenhum deles reproduza exatamente a malária humana, diferentes modelos mostram certos aspectos comuns da malária cerebral humana (Langhorne, 1994).

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

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

Nas pesquisas atuais envolvendo malária, o desenvolvimento de novos modelos de estudos torna-se importante para melhor elucidação de mecanismos envolvidos na

patogênese da doença. O fato do *P. gallinaceum* possuir biologia semelhante ao *P. falciparum*, sua infecção torna-se um interessante objeto de pesquisa dentro da malária. Após sua descoberta em 1935, foi considerado junto com outros plasmódios aviários, importante no estudo do tratamento terapêutico da malária humana. Este trabalho demonstra a infecção por *P. gallinaceum* como um modelo experimental importante para estudos em Malaria e pode servir como base científica para posteriores esclarecimentos a cerca da patogênese da malária cerebral. É interessante ressaltar que em vários momentos durante a evolução da doença encontramos aspectos que são semelhantes aos encontrados em outros modelos experimentais , inclusive com os da malária humana.

5.1 DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA CEREBRAL

Vários fatores estão envolvidos na sua causa, como espécie de plasmódio envolvida e ainda resposta do hospedeiro frente a essa infecção. Em geral, a malária cerebral é causa do seqüestro de parasitos na microvasculatura cerebral desencadeando diversas mudanças bioquímicas e imunológicas (Clark & Cowden, 2003; Sherman *et al.*, 2003). Dessa forma, a malária cerebral era diagnosticada geralmente quando um paciente com malária entrava em coma profundo, no entanto esta definição pode ser muito ampla e não reveladora desta doença cerebral . Burton (2004) realizou autópsia em crianças com malária cerebral clínica definida, e apenas 23% mostrou todos os sinais do seqüestro parasítico cerebral. Apesar de parasitêmicos e entrarem em coma, 77% das crianças investigadas morreram por uma variedade de outras razões, incluindo hematomas subdural, síndrome de Reye e sepse. Vale ressaltar que em todos os pacientes que tiveram o seqüestro parasítico cerebral, não se identificou uma causa alternativa da morte. O estudo sugere ainda um exame fundoscópico ocular, o que pode ajudar com mais precisão a identificar pacientes com malária cerebral antes da morte. Exames realizados em 20 indivíduos com seqüestro cerebral, 19 mostraram

hemorragias e edemas retinianos, não encontrado em outros casos de coma. Estes achados corroboram trabalhos de Chan-Ling *et al.* (1992) e Medana *et al.* (2001) que obtiveram resultados semelhantes utilizando *P. berghei*.

5.2 MODELO EXPERIMENTAL DE MALÁRIA CEREBRAL

5.2.1 Taxa de mortalidade

No nosso modelo de estudo, observou-se uma taxa elevada de mortalidade em aves infectadas com *P. gallinaceum*, que desenvolveram malária em resposta ao número de eritrócitos parasitados. O período de desenvolvimento da doença, com aparecimento das manifestações clínicas, agravamento do quadro e morte, foi de 12 dias pós-infecção, com pico de morte entre os dias 7 – 9. A partir do 10º dia não se observou morte no grupo de animais infectados, no entanto, 20% desses animais apresentaram uma redução no nível de parasitemia a partir do 7º dia pós-infecção, o que demonstra o envolvimento do sistema imunológico desses animais com resposta efetiva durante a infecção. Corroborando com nossos resultados Ferris *et al.* (1973) demonstraram uma elevada mortalidade na infecção por *P. gallinaceum*, sem observação de resposta satisfatória no sistema imune das aves. Estes achados estão de acordo com Rank & Weidanz (1979), que obtiveram resultados semelhantes.

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

14º dia de infecção (Belnoue *et al.*, 2003). Nossos resultados demonstram que 80% dos animais infectados morrem durante o período crítico da doença, enquanto em animais não infectados (controles), o índice de sobrevivência foi de 100%.

5.2.2 Manifestações clínicas

As características clínicas da infecção malárica dependem de vários fatores, sendo de maior importância fatores do hospedeiro e do parasito que podem transformar uma infecção assintomática em doença grave e mesmo morte.

De acordo com Clark & Cowden (2003), os sintomas típicos da infecção malárica são febre, náuseas e dores de cabeça, por vezes acompanhada por diarreia e vômito. Em condições de não tratamento, evolui para diversas manifestações, e em geral, malária cerebral. A partir dessas manifestações, surgem várias complicações, e como consequência a malária cerebral. Wroczywska *et al.* (2005), evidenciaram as manifestações características da doença e o envolvimento de citocinas no decorrer da doença. Dentre as manifestações clínicas encontradas, destaca-se anemia severa, problemas renais, edema pulmonar, hipoglicemia, colapso circulatório, convulsões, acidose metabólica e hemoglobinúria, fatores esses que levam ao coma.

Nosso estudo demonstrou algumas características clínicas e bioquímicas envolvidas na patogênese da doença, além da correlação direta com os níveis de parasitemia; características não encontradas nos animais do grupo controle. Dentre os sintomas mais frequentes e comuns encontramos em nosso modelo falta de apetite (anorexia), anemia (evidenciada pelos valores de hematócrito), febre; alteração no sistema locomotor e paralisia superficial de membros foram observados em animais com maior número de eritrócitos parasitados, como mostrado em trabalhos anteriores (Permin e Juhl, 2002) que evidenciaram maior gravidade em animais com maior número de parasitos no sangue. Como descrito na

literatura alguns animais apresentaram ataques convulsivos com posterior morte (Wroczywska *et al.*, 2005).

A resposta febril encontrada (entre 42°C e 43.3°C) com variação de até 2°C em relação ao valor normal (William, 1986b), fortalece o quadro clínico de infecção malárica, provavelmente pelo envolvimento de diversas citocinas, principalmente IL-1, IL-6 e TNF- α , produzido por macrófagos após indução pelo plasmódio (Bate *et al.*, 1988; Karunaweera *et al.*, 2003). Hunt & Grau (2003) atribuíram papel pirogênico a estas citocinas. Nossos resultados demonstraram variação na temperatura logo após surgimento de formas eritrocitárias do plasmódio, sugerindo fortemente a participação destas citocinas.

A imunidade celular mediada por citocinas, dentre elas TNF- α e INF- γ , possuem papéis ambíguos dentro da patogênese da malária, uma vez que estão envolvidas na resposta imunológica do hospedeiro e no quadro de manifestações clínicas causados pelo parasito. Isso pode explicar a redução encontrada na temperatura de animais com regressão nos níveis de parasitemia, mostrando que a resposta imunológica foi efetiva contra o parasito (Clark *et al.*, 1991; Wassmer *et al.*, 2003).

Os valores de hematócrito observados em nosso estudo demonstram uma diminuição no número de eritrócitos, provavelmente devido a um quadro de hemólise, provocado pelo próprio parasito. Resultados de acordo com estudos feitos por Soni & Cox (1975a, 1975b). A hemólise observada é diretamente proporcional ao aumento da parasitemia, evidenciando o parasitismo intraeritrocítico, fato observado por Williams (2005), que utilizou o *P. gallinaceum* como modelo de estudo para resistência a drogas antimaláricas.

Keller *et al.* (2004) descreveram a anemia com patogênese multifatorial e não unicamente pelo parasito, principalmente devido destruição de eritrócitos não parasitados pelo sistema imune e alterações na membrana da célula parasitada, o que provoca congestão de vasos. No nosso modelo, encontramos diminuição de até 44% nos valores de hematócrito

comparados ao grupo sem infecção, e esses valores mostraram-se dependentes do nível de parasitemia, fato observado com o aumento no valor do hematócrito e regressão da parasitemia nos animais que mantiveram infecção crônica. Nossos 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 eritropoese por ação de citocinas, como TNF- α , produzido durante a infecção como resposta do sistema imune (Clark & Cowden, 2003; Jaramillo *et al.*, 2004).

Durante o desenvolvimento da doença, na fase aguda, foi observado a produção de fezes com aspecto esverdeado, relacionada com os níveis de parasitemia e valores de hematócrito, de acordo com os trabalhos de Permin & Juhl (2002) e Williams (2005). Nos animais que evoluíram para a infecção crônica, não foi observado essa característica.

A malária cerebral não é consequência da infecção por si só, mas sim resulta de uma forte reação imunológica do hospedeiro frente ao parasito (Clark & Cowden, 2003).

5.2.3 Achados histopatológicos do cérebro

Diversos estudos têm demonstrado alterações neurológicas 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 tecido cerebral de aves infectadas com *P. gallinaceum*, demonstram claramente o sequestro de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral.

Mesmo em modelos diferentes, os resultados encontrados nesse trabalho 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. Além do aspecto espongiforme demonstrado, áreas com pequenas hemorragias focais foram descritas, semelhantes aos achados de Silamut *et al.* (1999). Concordando com os resultados de Wassmer *et al.* (2006), que demonstraram alterações no endotélio cerebral em malária *falciparum* e Hearn *et al.* (2000), em modelo de malária cerebral murina por *P. berghei*, foi demonstrado também nesse trabalho alterações vasculares com presença de vacuolização perineuronal.

Todos esses achados, de acordo com a literatura, são característicos de malária cerebral, fato que confirma a importância do modelo estabelecido. Apesar de todas as alterações descritas no quadro de malária cerebral, 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 pigmento sugestivo de pigmento malárico (figura 9D), confirmando a morte do animal por malária cerebral.

5.2.4 Efeito da infecção por *P. gallinaceum* na atividade da nos em cérebros

O papel do NO na imunidade à malária já foi evidenciado, e tem atividade antimicrobiana sobre o estágio eritrocítico assexuado do parasito da malária (Taylor-Robinson & Smith, 1999). Taylor-Robinson (1997) observou que a ativação da via metabólica L-arginina-NO exerce um efeito antimicrobiano sobre 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. Além disso, Clark *et al.* (1993) observaram que o NO possui um papel de controlar a parasitemia primária, pois com seu efeito vasodilatador, leva a um seqüestro menos eficiente nos microcapilares, o que facilita a remoção por macrófagos.

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 hemato-encefálica 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).

Nossos resultados demonstram uma atividade diminuída da enzima NOS em animais com baixa parasitemia comparados ao controle. Notamos ainda que, conforme aumento da parasitemia, a atividade enzimática foi aumentada. Estes achados estão de acordo com os trabalhos de Clark *et al.* (1992) e Brunet (2001), e 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 antiparasítico para o NO. Fato corroborado por Sobolewski *et al.* (2005b), que evidenciaram uma resistência à morte do *P. berghei* por espécies reativas de oxigênio, entre elas, o NO.

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* ANKA, não apresentaram alterações na sobrevivência e no

desenvolvimento da malária cerebral. Em nossos resultados, obtivemos mortes com parasitemia inferior a 40%, com baixa produção de NO, o que sugere envolvimento de diversos fatores na patogênese da doença.

Clark & Cowden (2003) demonstraram que a neurotoxicidade do glutamato pode ser prevenida por inibidores da NOS e que a nNOS fornece o NO que pode induzir a neurotoxicidade pelo glutamato. Logo, supõe-se que a liberação do NO pela nNOS e a produção de citocinas inflamatórias aumentada na malária, que por sua vez estimulam a liberação do NO pela iNOS devem ter contribuído para o comprometimento neurológico observado nos animais com parasitemias mais baixas, baseando-se nos estudo de Taylor-Robinson & Smith (1999), onde o NO apresentou um efeito dicotômico, ao mesmo tempo que controlou a parasitemia, aumentou a susceptibilidade à malária cerebral.

5.2.5 Produção de NO por macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico

Macrófagos secretam uma grande quantidade e variedade de citocinas e outras biomoléculas imunologicamente importantes, tais como reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, geralmente produtos da indução por estas citocinas (MacMicking *et al.*, 1997; Dil & Qureshi, 2002; Crippen *et al.*, 2003). Em macrófagos o NO é produzido pela iNOS ativada geralmente pela resposta do sistema imune, durante um quadro de infecção (Brunet, 2001) e é considerado importante mediador da função efetora de macrófagos.

Estudos que envolvem NO e malária demonstram resultados ambíguos, devido produção de NO por diferentes isorformas da enzima e local de produção. Nos nossos resultados sobre atividade da NOS em cérebro de aves infectadas com *P. gallinaceum*, observamos um nível basal elevado de NO no controle comparado aos animais infectados com diferentes níveis de parasitemia; no entanto, observou-se uma relação direta entre

aumento da produção e níveis de parasitemia com progresso da malária cerebral. Nesse contexto, investigamos a participação do NO produzido por macrófagos desses animais.

Macrófagos de animais controles demonstraram uma produção basal de nitrito quando comparado com macrófagos de animais controles ativados com LPS. Nossos dados demonstram ainda um aumento gradativo na produção de NO em animais infectados conforme aumento da parasitemia. Esses resultados contrastam com resultados obtidos por Boutlis *et al.* (2003), que observaram baixa atividade da iNOS em células monocucleares de indivíduos adultos em Papua Nova Guiné.

No entanto, os resultados encontrados estão de acordo com Clark *et al.* (1997), que sugerem um aumento da produção de NO pela ação da iNOS, após exacerbada resposta do sistema imune frente à infecção pelo parasito. Assim, o aumento da produção de NO observado em cérebros de animais infectados em elevadas parasitemias, pode ser devido a uma resposta imune desencadeada pelo *P. gallinaceum*. Outros achados que relacionam um aumento na atividade e expressão de iNOS com o desenvolvimento da malária cerebral humana e morte foram mostrados por Weiss *et al.* (1998). Estes resultados estão de acordo aos encontrados em nosso trabalho.

A diferença encontrada entre os macrófagos derivados de monócitos ativados com LPS e aqueles infectados sem estímulo com LPS não foi significativa. Resultado diferente foi obtido em macrófagos de animais não-infectados, com cerca de 120% de aumento em macrófagos ativados quando comparado a macrófagos não-ativados com LPS. Isso sugere uma inibição da estimulação com LPS causada pela infecção malárica, visto que Chi *et al.* (2003) também demonstraram uma resposta aumentada em macrófagos de camundongos para produção de NO quando estimulados com LPS. No entanto, novos estudos necessitam ser realizados para entender o mecanismo pelo qual isso ocorre.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem o modelo de malária cerebral aviária como uma ferramenta alternativa nos estudos a cerca da fisiopatologia da malária cerebral, por apresentar características comuns tanto à malária humana, quanto ao modelo experimental já estabelecido com *Plasmodium berghei*. Dessa forma, torna-se possível investigar diversos aspectos da patogênese da doença com finalidade de compreender os mecanismos envolvidos. Além disso, o modelo de malária cerebral aviária vai permitir testar novos produtos quimioterápicos obtidos de plantas medicinais.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho foi possível:

- Caracterizar um modelo experimental de malária cerebral em galinhas domésticas infectadas por *Plasmodium gallinaceum*.
- O mediador químico NO está envolvido na neurofisiopatologia da malária da malária cerebral.
- Este modelo será de grande utilidade para estudos de malária cerebral em humanos pela semelhança das manifestações clínicas descritas em infecções causadas por *Plasmodium falciparum*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHVAZI BC, JACOBS P and STEVENSON MM. Role of macrophage-derived nitric oxide in suppression of lymphocyte proliferation during blood-stage malaria. *Journal of Leucocyte Biology*, 58: 23-31, 1995.
- BATE CAW, TAVERNE J and PLAYFAIR JHL. Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology*, 64: 227-231, 1988.
- BAUMEISTER S, WINTERBERG M, DURANTON C, HUBER SM, LANG F, KIRK K, LINGELBACH K. Evidence for the involvement of *Plasmodium falciparum* proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. *Molecular Microbiology*, 60(2): 493 – 504, 2006.
- BELNOUE E, COSTA FTM, VIGÁRIO AM, VOZA T, GONNET F, LANDAU I, van ROOIJEN N, MACK M, KUZIEL WA and RÊNIA L. Chemokine receptor CCR2 is not essential for the development of experimental cerebral malaria. *Infection and Immunity*, 71(6): 3648 – 3651, 2003.
- BERENDT AR, TURNER GDH and NEWBOLD CL. Cerebral Malaria: The Sequestration Hypothesis. *Parasitology Today*, 10(10): 412-414, 1994.
- BOGDAN C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2(10): 907-916, 2001.
- BOS W and De SOUZA W. Phagocytosis of yeast: A method for concurrent quantification of binding and internalization using differential interference contrast microscopy. *Journal of Immunological*, 238: 29-43, 2000.
- BOUHAROUN-TAYOUN H, ATTANATH P, SABCHAREON A, CHONGSUPHAJAISIDDHI T, DRUILHE P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *Journal Experimental Medicine*, 172(6): 1633-41, 1990.
- BOUHAROUN-TAYOUN H, OEUVRAY C, LUNEL F, DRUILHE P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Journal Experimental Medicine*, 182(2): 409-18, 1995.

- BOUTLIS CS, TJITRA E, MANIBOEY H, MISUKONIS MA, SAUNDERS JR, SUPRIANTO S, WEINBERG JB and ANSTEY NM. Nitric oxide production and mononuclear cell nitric oxide synthase activity in malaria-tolerant Papuan adults. *Infection and Immunity*, 71 (7): 3682 – 3689, 2003.
- BOUTLIS 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 (12): 6932 – 6938, 2004.
- 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.
- BURTON A. When is cerebral malaria not cerebral malaria? *The Lancet Neurology* (3): 2004.
- CARVALHO LJM, LENZI HL, PELAJO-MACHADO M, OLIVEIRA DN, DANIEL-RIBEIRO CT, FERREIRA-DA-CRUZ MF. *P. berghei*: cerebral malaria in CBA mice is not clearly related to plasma TNF levels or intensity of histopathological changes. *Experimental Parasitology*, 95: 1 – 7, 2000.
- CHAN-LING T, NEILL AL and HUNT NH. Early microvascular changes in murine cerebral malaria detected in retinal wholemounts. *American Journal of Pathology*, 140 (5): 1121 – 1130, 1992.
- CHI DS, QUI M, KRISHNASWAMY G, LI C and STONE W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. *Nitric Oxide*, 8: 127 – 132, 2003.
- CLARK IA, ROCKETT KA and COWDEN WB. Proposed link between cytokines, nitric oxide and human cerebral malaria. *Parasitology Today*, 7(8): 205-207, 1991.
- 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, ROCKETT RA, COWDEN WB. TNF in cerebral malaria. *Q J Med*, 86(3): 217-8, 1993.

- CLARK IA, AL YAMAN FM and JACOBSON LS. The biological basis of malaria disease. *International Journal for Parasitology*, 27(10): 1237-1249, 1997.
- CLARK IA, SCHOFIELD L. Pathogenesis of malaria. *Parasitology Today*, 16(10): 451-4, 2000.
- CLARK IA, COWDEN WB. The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacology Therapy*, 99(2): 221-60, 2003.
- CORTÉS A, MELLOMBO M, MGONE CS, BECKC HP, Reeder JC and Cooke BM. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells to CD36 under flow is enhanced by the cerebral malaria-protective trait South-East Asian ovalocytosis. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 142: 252-257, 2005.
- CRIPPEN TL, SHEFFIELD CL, HE H, LOWRY VK and KOGUT MH. Differential nitric oxide production by chicken immune cells. *Development Comparative Immunology*, 27 (6-7): 603-10, 2003.
- CROW JP and BECKMAN JS. Reactions between nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: foot prints of peroxynitrite *in vivo*. *Advances in Pharmacology*, 17-43, 1995.
- DAMATTA R, MANHÃES LDS, SEABRA SH and DE SOUZA W. Co-culture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. *Biocell*, 22(1): 45-52, 1998.
- DANIEL-RIBEIRO CT and 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 (4/5): 269-281, 2000.
- DAWSON TM and SNYDER SH. Gases as biological messenger: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *The journal of Neuroscience*, 14: 5147-5159, 1994.
- DAWSON TM, STEINER JP, DAWSON VL, DINERMAN JL, UHL GR, SNYDER SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(21): 9808-9812, 1993.
- DE SOUZA JB and 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.
- DIL N and QURESHI MA. Involvement of lipopolysaccharide related receptors and nuclear factor κ B in differential expression of inducible nitric oxide synthase in chicken macrophages from different genetic backgrounds. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 88 (3-4): 149 – 61, 2002.
- DIL N and QURESHI MA. Interleukin-1 β does not contribute to genetic strain-based differences in iNOS expression and activity in chicken macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 137–146, 2003.
- DREW C, LAPAIX F, EGEE S, THOMAS S , ELLORY JC and STAINES HM. Age-dependent changes in cation transport in the chicken erythrocyte. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 133: 169 – 178, 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.
- EKALA MT, JOUIN H, LEKOULOU F, ISSIFOU S, MERCEREAU-PUIJALON O and NTOUMI F. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1): genotyping and humoral responses to allele-specific variants. *Acta Tropica*, 81: 33-46, 2002.
- FERREIRA-DA-CRUZ MF and DANIEL-RIBEIRO CT. Malária. In: Doenças Infecciosas e Parasitárias. VERONESI R. (ed), Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 1260-1289, 1996.
- 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 and KLEINERT H. Nitric oxide synthase isoenzymes: characterization, molecular cloning and functions. *Hypertension*, 23: 1121-1131, 1994.

- FÖRSTERMANN U, GATH I, SCHWARZ P, CLOSS EI and KLEINERT H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochemical Pharmacology*, 50 (9): 1321-1332, 1995.
- FURCHGOTT RF and ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376, 1980.
- GARTHWAITE J and BOULTON CL. Nitric oxide signaling in the CNS. *Annual Reviews Physiology*, 683-706, 1996.
- GAUR D, GHISLAINE-MAYER DC and MILLER LH. Parasite ligand–host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *International Journal for Parasitology*, 34: 1413-1429, 2004.
- GHIGO D, TODDE R, GINSBURG H, COSTAMAGNA C, GAUTRET P, BUSSOLINO F, ULLIERS D, GIRIBALDI G, DEHARO E, GABRIELLI G, PESCARMONA G and BOSIA A. Erythrocyte stages of *Plasmodium falciparum* exhibit a high nitric oxide synthase (NOS) activity and release an NOS-inducing soluble factor. *Journal Experimental Medicine*, 182: 677-688, 1995.
- 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(3): 461-6, 2003.
- GREEN LC, WAGNER DA and 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.
- HALDAR K, HILLER NL, van OOIJ C and BHATTACHARJEE S. *Plasmodium* parasite proteins and the infected erythrocyte. *Trends in Parasitology*, 21(9): 402-403, 2005.
- 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(9): 5364-5376, 2000.

- HEDDINI A. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. *International Journal for Parasitology*, 32: 1587-1598, 2002.
- HUNT NH and GRAU GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in Immunology*, 24 (9): 491-499, 2003.
- IDRO R, JENKINS NE and NEWTON CR. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *The Lancet Neurology*, 4(12): 827-40, 2005.
- IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE and CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9265-9269, 1987.
- IGNARRO 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(1): 218 – 226, 1988.
- 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.
- KAMPFL AW, PFAUSLER BE, HARING HP, DENCHEV D, DONNEMILLER E, SCHMUTZHARD E. Impaired microcirculation and tissue oxygenation in Human Cerebral Malaria: a single photon emission computed tomography and near-infrared spectroscopy study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56(6): 585-87, 1997.
- KARUNAWEEERA ND, WIJESEKERA SK, WANASEKERA D, MENDIS KN, CARTER R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitology*, 19(4): 188-93, 2003.
- 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. *Infect Immun*, 72(8): 4868-73, 2004.
- KIRCHGATTER K and DEL PORTILLO HA. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(3) - Rio de Janeiro, 2005.

- KRETTLI AU. The immune response to malaria sporozoite antigens in animal models and humans: A retrospective overview and present goals. *Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)*, 46(5/6), 1994.
- KWIATKOWSKI D, HILL AVS, SAMBOU I, TWUMASI P, CASTRACANE J, MANOGUE KR, CERAMI A, BREWSTER DR and GREENWOOD BM. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet*, 336: 1201-1204, 1990.
- KWIATKOWSKI D, BATE CAW, SCRAGG IG, BEATTIE P, UDALOVA I and KNIGHT JC. The malarial fever response-pathogenesis, polymorphism and prospect for intervention. *Annal Tropical Medicine and Parasitology* 91(5): 533-542, 1997.
- LA PIRRIT, LH FREITAS-JÚNIOR, PA BUFFTET, J GYSIN, A SCHER *Ciência e Cultura Journal Brazilian Association for the Advancement of Science July/October 2000*.
- LADDA R, AIKAWAT M and SPRINZ H. Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian malarial parasites. *Journal of Parasitology*, 87(3): 470-478, 2001.
- LAM KM. Studies en chicken peripheral blood monocytes. *Comparative Haematology International*, 9(3): 142-147, 1999.
- LANGHORNE J. The immune response to the blood stages of *Plasmodium* in animal models. *Immunology Letters*, 41: 99-102, 1994.
- MACMICKING J, XIE QW and NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Reviews Immunology*, 15: 323-50, 1997.
- MALAGUARNERA and MUSUMECI. Role of proinflamamtory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet*, 2: 719-720, 2002.
- McCANN SM. The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Experimental Gerontology*, 32: 431-440, 1997.
- MCCUTCHAN TF, KISSINGER JC, TOURAY MG, ROGERS MJ, LI J, SULLIVAN M, BRAGA EM, KRETTLI AU and MILLER LH. Comparision of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: Biological and phylogenetic implications (*Plasmodium apicomplexa* evolution sporozoite invasion cell adhesion motif). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11889-11894, 1996.

- MEDANA IM, CHAUDRHI G, CHAN-LING T and 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.
- MENDIS K, SINA BJ, MARCHESINI P, CARTER R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 64(1-2 Suppl): 97-106, 2001.
- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43: 109-142, 1991.
- MOORE SA, SURGEY EG, CADWGAN AM. Malaria vaccines: where are we and where are we going? *Lancet Infectious Diseases*, 2(12): 737-43, 2002.
- OKOKO BJ and OTA MOC. The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis. *Acta Tropica*, 87: 193-205, 2003.
- PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122): 524-526, 1987.
- PERMIN A and JUHL J. The development of *Plasmodium gallinaceum* infections in chickens following single infections with three different dose levels. *Veterinary Parasitology*, 105: 1-10, 2002.
- PERMIN A, ESMANN JB, HOJ CH, HOVE T, MUKARATIRWA S. Ecto-, endo- and haemoparasites in free-range chickens in the Goromonzi District in Zimbabwe. *Preventive veterinary Medicine*, 54: 213-224, 2002.
- PÓVOA MM, DA SILVA ANM, DOS SANTOS CCB, SEGURA MNO and MACHADO RLD. Malaria transmission. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* 52 (4/5): 208-212, 2000.
- QURESHI MA and MILLER L. Comparison of macrophage function in several commercial broiler genetic lines. *Poultry Science*, 70: 2094-2101, 1991.
- RAMASAMY R. Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1406: 10-27, 1998.

- RAMIREZ AD, ROCHA EM and KRETTLI AU. *In vitro* development of exoerythrocytic forms of *Plasmodium gallinaceum* sporozoites in avian macrophages. *Journal Protozoology*, 38 (1): 40-44, 1991.
- RICHIE TL and SAUL A. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature*, 415(6872): 694-701, 2002.
- RILEY EM, WAHL S, PERKINS DJ and SCHOFIELD L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunology*, 28(1-2): 35-49, 2006.
- RUDIN W, FAVRE N and RYFFEL B. Study of cerebral malaria using *Plasmodium berghei* and various knock-out mouse strains. *Immunology Letters*, 56: 424, 1997.
- SCHALL JJ. The ecology of lizard malaria. *Parasitology Today* 6(8): 264-269, 1990.
- SHARMA JM. Overview of the avian immune system. *Veterinary Immunology*, (1):13-17, 1991.
- SHERMAN IW, EDA S and WINOGRAD E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes and Infection*, 5: 897-909, 2003.
- SHERMAN IW, EDA S and WINOGRAD E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes and Infection*, 5: 897-909, 2003.
- SHINGADIA D and SHULMAN ST. Recognition and Management of Imported Malaria in Children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 11(3): 172-177, 2000.
- SHINYASHIKI M, CUMAGAI Y, NAKAJIMA H, NAGAFURE J, HOMMATAKEDA S and SHIMOTO N. Differential changes in rat brain nitric oxide synthase *in vivo* and *in vitro* by methylmercury. *Brain Research*, 798: 147-155, 1998.
- SIEBERT H and BRUCK W. The role of cytokines and adhesion molecules in axon degeneration after peripheral nerve axotomy: a study in different knockout mice. *Brain Research*, 960: 152-156, 2003.
- SILAMUT K, PHU NH, WHITTY C, TURNER GD, LOUWRIER K, MAI NT, SIMPSON JA, HIEN TT and WHITE NJ. A quantitative analysis of the microvascular sequestration

- of malaria parasites in the human brain. *American Journal Pathology*, 155(2): 395-410, 1999.
- SLATER LB. Malarial Birds: Modeling Infectious Human Disease in Animals. *Bull. Hist. Med.*, 79: 261-294, 2005.
- SNOW RW, GUERRA CA, NOOR AM, MYINT HY and HAY SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434: 214-217, 2005.
- SOBOLEWISKI P, GRAMAGLIA I, FRANGOS J, INTAGLIETTA M and VAN DER HEYDE HC. Nitric oxide bioavailability in malaria. *TRENDS in Parasitology*, 21(9): 415-422, 2005a.
- SOBOLEWSKI P, GRAMAGLIA I, FRANGOS JA, INTAGLIETTA M and van der HEYDE H. *Plasmodium berghei* resists killing by reactive oxygen species. *Infection and Immunity*, 73 (10): 6704-6710, 2005b.
- 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(2): 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(3): 423-30, 1975b.
- SOUZA JM, COUTO AAR, SILVA EB, ABDON NP, SILVA RSU. Malária. In: Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. LEÃO NQ (ed). Belém, CEJUP, 645-669, 1997.
- STAINES HM, GODFREY EM, LAPAIX F, EGEE S, THOMAS S and ELLORY C. Two functionally distinct organic osmolyte pathways in *Plasmodium gallinaceum*-infected chicken red blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1561: 98-108, 2002.
- SULLIVAN AD, ITTARAT I and MESHNICK SR. Patterns of haemozoin accumulation in tissue. *Parasitology*, 112: 285-94, 1996.
- TAYLOR-ROBINSON AW. Immunoregulation of malarial infection: balancing the vices and virtues. *International Journal for Parasitology*, 28: 135-148, 1998.

- [TAYLOR-ROBINSON AW and SMITH EC.](#) A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunology Letters*, 67 (1): 1 – 9, 1999.
- TAYLOR-ROBINSON AW. The sequestration hypothesis: an explanation for the sensitivity of malaria parasites to nitric oxide-mediated immune effector function in vivo. *Medical Hypotheses*, 54(4): 638-641, 2000.
- THOMAS SLY, EGÉE S, LAPAIX F, KAESTNER L, STAINES HM and ELLORY JC. Malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* up-regulates host red blood cell channels. *FEBS Letters*, 500 (1-2): 45-51, 2001.
- TREERATANAPIBOON L, PSATHAKI K, WEGENER J, LOOAREESUWAN S, GALLA HJ, AND UDOMSANGPETCH R. In vitro study of malaria parasite induced disruption of blood–brain barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335: 810-818, 2005.
- URBAN BC and ROBERTS DJ. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells. *Current Opinion in Immunology*, 14: 458-465, 2002.
- VAN DER HEYDE HC, GU Y, ZHANG Q, SUN G and GRISHAM MB. Nitric oxide is neither necessary nor sufficient for resolution of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice. *The Journal of Immunology*, 165: 3317-3323, 2000.
- WAHLGREN M, CARLSON J, HELMBY H, HEDLUND I and TREUTIGER CJ. Molecular mechanisms and biological importance of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 323-329, 1992.
- WAHLGREN M, FERNANDEZ V, SCHOLANDER C and CARLSON J. Rosetting. *Parasitology Today*, 10: 73-79, 1994.
- WASSMER SC, COMBES V and GRAU GE. Pathophysiology of cerebral malaria. Role of host cells in the modulation of cytoadhesion. *Annals New York Academy Science*, 992: 30-38, 2003.
- WASSMER SC, COMBES V, CANDAL FJ, JUHAN-VAGUE I and GRAU GE. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by *Plasmodium falciparum*. *Infectious Immunology*, 74(1): 645-53, 2006.

- WEIDANZ WP, MELANCON-KAPLAN J and CAVACINI LA. Cell-mediated immunity to the asexual blood stages of malarial parasites: Animal models. *Immunology Letters*, 25 (1-3): 87-95, 1990.
- WEISS G, THUMA PE, BIEMBA G, MABEZA G, WERNER ER and GORDEUK VR. Cerebrospinal fluid levels of biopterin, nitric oxide metabolites, and immune activation markers and the clinical course of human cerebral malaria. *Journal Infectious Disease*, 177 (4): 1064-8, 1998.
- WHITE NJ. Malaria pathophysiology. In: *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. Washington DC: **ASM Press**, p. 371-385, 1998.
- WILLIAMS RB. Packed cell volume of blood from male domestic chicks. *British Poultry Science*, 27: 483-485, 1986a.
- WILLIAMS RB. Body temperatures of chicks of the domesticated fowl (*Gallus gallus*). *Zootecnica International*, 10: 61, 1986b.
- WILLIAMS RB. The efficacy of a mixture of trimethoprim and sulphaquinoxaline against *Plasmodium gallinaceum* malaria in the domesticated fowl *Gallus gallus*. *Veterinary Parasitology*, 129: 193-207, 2005.
- WROCZYNSKA A, NAHORSKI W, BAKOWSKA A, PIETKIEWICZ H. Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease. *Int Marit Health*, 56(1-4): 103-14, 2005.
- XAVIER MMSP and REBELO JMM. Espécies de *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) em área endêmica de malária. Maranhão, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 33(6): 535-541, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)