

AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA MALÁRIA AVIÁRIA EM *GALLUS
GALLUS DOMESTICUS* CAUSADA POR *PLASMODIUM
GALLINACEUM*

FARLEN JOSE BEBBER MIRANDA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES

FEVEREIRO, 2014

AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA MALÁRIA AVIÁRIA EM *GALLUS
GALLUS DOMESTICUS* CAUSADA POR *PLASMODIUM
GALLINACEUM*

FARLEN JOSE BEBBER MIRANDA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia, como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia e
Biotecnologia, área de concentração
Biologia Celular, linha de Pesquisa
Biologia Celular e Mecanismos da
Interação Celular.

Coorientador: Prof. Dr. João Luis Mendes Wanderley

Orientador: Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta

CAMPOS DOS GOYTACAZES

FEVEREIRO, 2014

AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA MALÁRIA AVIÁRIA EM *GALLUS GALLUS DOMESTICUS* CAUSADA POR *PLASMODIUM GALLINACEUM*

FARLEN JOSE BEBBER MIRANDA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular, linha de Pesquisa Biologia Celular e Mecanismos da Interação Celular.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a.Nadia Regina Pereira Almosny (D.Sc, Ciências Veterinárias) – UFF

Prof. Clóvis de Paula Santos (D.Sc., Parasitologia Veterinária) – UENF

Prof^a Olney Vieira da Motta (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof. João Luis Mendes Wanderley (D. Sc, Ciências Morfológicas) - UFRJ
(Coorientador)

Prof. Renato Augusto DaMatta (D.Sc., Ciências Biológicas) - UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A meus pais, Nivaldo e Maria Terezinha, pelo que sou.

À minha irmã Kamila, pela doce companhia.

À minha companheira Luize, pela paciência, incentivo e amor.

À toda minha família. Em especial ao meu tio Maurício e minha avó Sebastiana, que nos deixaram neste período.

Ao professor Antonio Albernaz, orientador de Monitoria, Iniciação Científica e Mestrado. Por ter visto em mim um potencial pesquisador nas aulas práticas de Patologia Clínica da graduação.

Ao professor Dalton Garcia, por ter despertado o gosto pela Parasitologia.

À UENF, onde me formei em Medicina Veterinária e obtive o título de mestre em Ciência Animal.

Ao professor Clóvis Santos, pela agradável companhia nos congressos e pela confiança em mim e no meu trabalho.

Aos alunos do LBCT. Em particular os pós graduandos do Setor de Biologia Parasitária, que me receberam muito bem, sempre dispostos a ajudar em tudo.

Aos alunos de pós graduação Juliana Azevedo e Gabriel Rabello, e aos alunos de pós doutorado Diogo Benchimol e Edwards Frazão, pelas ajudas em experimentos.

À aluna de iniciação científica Gisela Galaxe, pela amizade e ajuda com experimentos.

Aos alunos de pós-graduação Saulo Pireda, Thiago Alves e Thiago Torres, Laura Miranda e Juliana Padrão, do LBCT, Maycon, Flávia e Lívia do LBR pelas conversas descontraídas, embora escassas pela rotina de trabalho.

Aos técnicos do biotério. Sem as ajudas essenciais de Fábio Oliveira, Paulo e Marício os experimentos com animais simplesmente não aconteceriam. Além de serem pessoas amigas.

Aos técnicos do LBCT, Adriana, Beatriz, Darli, Giovana, Luciana, Márcia e Rosemary. Especialmente Adriana pelas suas palavras motivadoras, Darly Grativol pelos conselhos, Rosemary pela confiança e Beatriz pela alegria contagiante.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia. As secretárias Marlene e Beatriz. E as coordenadoras deste período, professoras

Kátia Valevski e Olga Machado, que lutaram muito pelo Programa. Também a todos os professores do Programa.

Aos professores que ajudaram nos trabalhos científicos. Especialmente os professores Antonio Albernaz, Eulógio Queiróz, e Francisco Oliveira.

À professora Antoniana Ursine Krettli, do centro de Pesquisas René Rachou, MG, por ceder a cepa 8A de *Plasmodium gallinaceum*.

Aos técnicos de laboratório do Hospital Veterinário Orlando Augusto e Josias Machado da Patologia Clínica; e Elisabete, Guerreiro, Luciana e Luciano da Patologia.

Aos professores Milton Kanashiro, Antonio Albernaz e Eulógio Queiróz pela participação na qualificação.

Aos professores José Luiz Martins do Nascimento e Barbarella Macchi, da UFPA, e a mestranda Fernanda Souza da Silva, sem os quais este trabalho não seria feito.

Ao professor Arthur Guimarães, por revisar a tese.

À professora Nadia Almosny, e professores Clóvis Santos e Olney Motta por aceitarem contribuir fazendo parte da banca de tese. E o professor Enrique Medina e Julia Peralta pela disposição em contribuir, sendo suplentes.

Ao coorientador professor João Wanderley, pelo companheirismo, ajuda com os experimentos e ensinamentos em Imunologia.

Ao professor Renato DaMatta, pela amizade, ensinamentos de Biologia Celular e minha formação científica.

Meus agradecimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMA - Dimetil arginina assimétrica
AG - Aminoguanidina
ALT – Alanina amino transferase
AST – Aspartato amino transferase
BSA – Albumina de soro bovina
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média
CEUA - Comissão de Ética de Uso Animal
CID – Coagulação intravascular disseminada
DPI – Dias pós infecção
DMEM - *Dulbecco's modified Eagle medium*
e-NOS ou NOS3 – Óxido nítrico sintase endotelial
EDTA - Ácido-etileno-diamino-tetracético
GPI – Glicosilfosfatidilinositol
Hb - Hemoglobinometria
He - Hematimetria
ICAM-1 - *Intercellular adhesion molecule-1*
IFN- γ – Interferon gamma
IL - Interleucina
iNOS ou NOS2 – Óxido nítrico sintase induzida
LDH – Lactato desidrogenase
MC – Malária cerebral
MHC II – Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MP – Micropartículas
MIF - Fator inibidor de migração de macrófagos
MIP - Proteína inflamatória de macrófagos
MMP - Matriz metaloproteinase
NETs - *Neutrophil extracellular traps*
NF- κ B - Fator de transcrição nuclear kappa B
NK –Células *natural killers*
NKT – Células *natural killer T*
LPS – lipopolissacarídeo de membrana bacteriano
n-NOS ou NOS1 – Óxido nítrico sintase neuronal
NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão Fosfato Salino

PfEMP1 - *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane proteins 1*

PF4 - *Platelet Factor 4*

PMIF – Fator inibidor de migração de macrófago secretado por *Plasmodium*

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1 - *vascular cell adhesion molecule 1*

VG – Volume globular ou hematócrito

VGM - Volume globular médio

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Ciclo evolutivo das malárias humanas.	5
Figura 2: Ciclo biológico do gênero <i>Plasmodium</i> em aves.	13
Figura 3: Curvas de mortalidade entre os grupos infectados tratados (■) ou não (●) com aminoguanidina.	31
Figura 4: Parasitemias médias dos grupos tratado (■) e não tratado (●) com aminoguanidina.	32
Figura 5: Contagem de eritrócitos por μL de sangue de animais controle (NI), infectados não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina.	34
Figura 6: VCM de animais controle (NI), infectados não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina.	35
Figura 7: Hematócrito de animais controle (NI), não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina.	36
Figura 8: Concentração de Hemoglobina Média – Hemoglobinometria (Hb) de animais controle (NI), não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina.	37
Figura 9: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) de animais controle (NI), não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina.	38
Figura 10: Esfregaços sanguíneos de frangos controle (a-b) e infectados por <i>Plasmodium gallinaceum</i> (c-f).	40
Figura 11: Detalhamento morfológico das hemácias infectadas.	41
Figura 12: Contagem do número de linfócitos.	42
Figura 13: Contagens de monócitos durante o período experimental.	43
Figura 14: Gráfico demonstrativo da contagem de heterofilos.	44
Figura 15: Morfologia de linfócitos.	46
Figura 16: Morfologia de monócitos.	47
Figura 17: Morfologia heterofílica.	48
Figura 18: Contagem de trombócitos de animais controle (NI), infectados não tratados (barra cinza) e tratados com aminoguanidina (barra negra).	49
Figura 19: Demonstração de trombócitos de animais controle (a-e) e infectados por <i>Plasmodium gallinaceum</i> (f-t).	50
Figura 20: Infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> em trombócitos.	50
Figura 21: Trombócitos de galinhas após 1 hora em cultura.	51
Figura 22: Mensuração de NO plasmático em animais controle (NI), infectados não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina.	53
Figura 23: Histologia de encéfalos de animais controle (a,b) e infectados com <i>Plasmodium gallinaceum</i> (c-f)	55
Figura 24: Histopatologia do fígado de animais controle (a,b) e infectados com <i>Plasmodium gallinaceum</i> (c-f).	57
Figura 25: Histopatologia do baço de animais controle (a,b) e infectados com <i>Plasmodium gallinaceum</i> (c-f).	58
Tabela 1: Tamanho de linfócitos e monócitos dos animais controle e infectados ao longo da infecção.	45

RESUMO

A malária é a doença infecciosa mais letais para o homem, embora muito de sua patogênese permaneça obscura. A malária também causa doença e óbito em animais, portanto, tem implicância econômica. A importância do óxido nítrico é um ponto controverso nas malárias, pois apesar de estar envolvido, não há um consenso sobre sua implicância na patogenia. Modelos experimentais são um bom meio de obtenção de conhecimento da patogenia infecciosa e fatores envolvidos. *Plasmodium gallinaceum* é um protozoário intracelular causador da mais patogênica malária aviária. Infecções experimentais usando *P. gallinaceum* servem de modelo de estudo para malária em aves. *Plasmodium falciparum* causa a mais grave malária humana, e por terem similaridades filogenéticas e patológicas, infecção por *P. gallinaceum* pode servir de modelo de estudo para malária humana. Nesse trabalho, foi utilizado a aminoguanidina para inibir a enzima óxido nítrico sintase induzida, levando a redução na produção de óxido nítrico em galinhas infectadas por *P. gallinaceum*, observando-se a patofisiologia dos animais tratados. Animais não tratados com aminoguanidina desenvolveram patogênese típica de malária aviária, com alta mortalidade. A anemia desenvolvida foi macrocítica hipocrômica, com forte resposta medular e liberação de formas jovens na circulação. Foi observado aumento da ativação leucocitária no transcorrer da infecção, com monócitos vacuolados, linfócitos grandes e heterófilos tóxicos. Trombócitos com alteração morfológica foram descritos apresentando grande tamanho, forma arredondada, muitos vacúolos e binucleados. As alterações clínicas observadas foram apatia, anorexia, alteração de postura corporal, eriçamento de penas, palidez de mucosa e alterações neurológicas. O tratamento com aminoguanidina resultou em abrandamento dos sinais clínicos, diminuição das lesões no fígado e baço, menor depósito de hemozoína, além de maior sobrevivência. Nos animais tratados houve redução de anemia e trombocitopenia, embora tenham tido maiores parasitemias. Níveis plasmáticos de óxido nítrico estão aumentados na malária aviária causada por *P. gallinaceum*, e sua inibição é um fator positivo para a saúde do animal.

Palavras Chave: Inflamação, Coagulopatia, Anemia, Óxido nítrico, Galinhas, Malária

ABSTRACT

Malaria is the most important parasitic disease to humankind, but little is known about its detailed pathogenesis. Malaria is also economically important because production animals also get sick or die. Besides involved in cerebral malaria, nitric oxide has a controversial function in the development of malaria diseases. Experimental models are extremely necessary to improve the knowledge of malaria. *Plasmodium gallinaceum* is an intracellular protozoan that cause the most pathogenic avian malaria, and its phylogenetic proximity to *P. falciparum* makes chicken animal model as a good alternative. In this work, we have used aminoguanidine to inhibit inducible nitric oxide synthase and consequently reduced the nitric oxide levels. Untreated chickens developed classical clinic pathological alterations, like paleness of the mucosae, anorexia, anemia, neurological signs and high mortality. Strong medullar response and consequently macrocytic hypochromic anemia was observed and correlated with great amounts of immature erythrocytes in blood. The leukocytes were activated, lymphocytes were bigger in size, monocytes presented many vacuoles and heterophils presented many toxic granules. Thrombocytopenia was an important alterations and thrombocytes were activated. Treatment with aminoguanidine reduced the pathological development of malaria, with treated chickens showing the same symptoms, but in a mild form. Treated chickens were less anemic and were protected against thrombocytopenia, but controversially, developed higher parasitemia. In conclusion, nitric oxide inhibition was protective against avian malaria in the *P. gallinaceum* model.

Key Words: Inflammation, Coagulopathy, Anemia, Nitric Oxide, Chickens, Malaria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	Revisão de Literatura	3
2.1	Gênero <i>Plasmodium</i>	3
2.1.1	Ciclo de Vida	3
3	Fisiopatologia Malárica	5
3.1	Anemia	5
3.2	Inflamação: envolvimento do sistema imune na malária	7
3.3	Óxido Nítrico e Malária	9
3.4	Coagulopatia	10
4	<i>Plasmodium gallinaceum</i>	11
4.1	Vetores	12
4.2	Ciclo de Vida do <i>Plasmodium gallinaceum</i>	12
4.3	Patogenia da Infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	13
5	Hematologia de Galinhas	15
5.1	Hemácias	15
5.2	Leucócitos	16
5.2.1	Eosinófilos	16
5.2.2	Basófilos	17
5.2.3	Monócitos	17
5.2.4	Linfócitos	17
5.2.5	Heterofilos	18
6	Justificativa	20
7	Objetivos Gerais	21
7.1	Objetivos Específicos	21
8	Material e Métodos	22
8.1	Aspectos Éticos da Experimentação	22
8.2	Parasito	22
8.3	Animais experimentais	22
8.4	Inibição da Produção de Óxido Nítrico <i>in vivo</i>	23
8.5	Infecção Experimental	23
8.6	Avaliação Clínica	24
8.7	Parasitemia	24
8.8	Mortalidade	25
8.9	Análise Hematológica	25
8.10	Morfometria de Leucócitos e Trombócitos	27
8.11	Bioquímica Sérica	27
8.12	Histopatologia	28
8.13	Quantificação de Óxido Nítrico Plasmático	28
8.14	Cultura de Trombócitos	29
8.15	Imunofluorescência de Trombócitos	29
8.16	Análises Estatísticas	30
9	Resultados	31
9.1	Sobrevivência	31
9.2	Parasitemia	31
9.3	Sinais Clínicos	32
9.4	Hematologia	33
9.5	Eritrograma	33

9.5.1	Eritrometria	33
9.5.2	Volume Corpuscular Médio	35
9.5.3	Volume Globular ou Hematócrito	36
9.5.4	Hemoglobinometria	37
9.5.5	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média	38
9.5.6	Alterações Morfológicas dos Eritrócitos	39
10	Leucograma	41
10.1	Leucometria Global	41
10.2	Leucometria Específica	41
10.2.1	Eosinófilos	41
10.2.2	Linfócitos	42
10.2.3	Monócitos	43
10.2.4	Heterófilos	44
10.2.5	Morfologia e Morfometria dos Leucócitos	44
11	Trombócitos	49
11.1	Cultivo de Trombócitos	51
12	Bioquímica Sérica	51
13	Quantificação de Óxido Nítrico Plasmático	52
14	Necrópsia e Histopatologia	54
14.1	Cérebro	54
14.2	Fígado	56
14.3	Baço	58
15	Discussão	59
15.1	Sobrevivência	59
15.2	Parasitemia	59
15.3	Sinais Clínicos	60
15.4	Hematologia	60
15.4.1	Eritrometria	61
15.4.2	Volume Corpuscular Médio – VCM	62
15.4.3	Volume Globular ou Hematócrito – VG	63
15.4.4	Hemoglobinometria	63
15.4.5	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média -CHCM	64
15.4.6	Morfologia e Infecção Eritrocitária	64
15.5	Leucograma	65
15.5.1	Eosinófilos	66
15.5.2	Linfócitos	66
15.5.3	Monócitos	67
15.5.4	Heterófilos	68
15.6	Trombócitos	69
15.7	Bioquímica Sérica	71
15.7.1	Alanina Amino Transferase – ALT	71
15.7.2	Aspartato Amino Transferase – AST	71
15.7.3	Lactato Desidrogenase – LDH	71
15.7.4	Colesterol	72
15.7.5	Ureia	72
15.7.6	Ácido Úrico	72
15.7.7	Creatinina	73
15.8	Quantificação de Óxido Nítrico Plasmático	73

15.9	Histopatologia	74
15.9.1	Histopatologia Encefálica	74
15.9.2	Necrópsia e Histopatologia Hepática	75
15.9.3	Necrópsia e Histopatologia do Baço	77
16	Conclusão	78
	REFERÊNCIAS	79

1 Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a malária humana é uma doença infecciosa causada por cinco espécies dentro do gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. A transmissão da malária humana é realizada exclusivamente por mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo *P. falciparum* e *P. vivax* as mais prevalentes, e *P. knowlesi* a última espécie descrita. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2012 houve aproximadamente 207 milhões de casos de malária humana e 627 mil mortes. A maioria das mortes ocorre no continente africano, onde a cada minuto morre uma criança (OMS, 2013).

A malária aviária pode ser causada por espécies dos gêneros *Leucocytozoon*, *Plasmodium* e *Haemoproteus*, sendo que dentro do gênero *Plasmodium*, mais de 40 espécies infectam aves. Pássaros silvestres podem servir de reservatórios para as espécies domésticas (Valkiunas, 2005). O gênero *Plasmodium* foi descrito em aves domésticas, a exemplo de *P. gallinaceum* (Macchi *et al.*, 2010) e *P. juxtannucleare* (Silveira *et al.*, 2009) em galinhas, *P. durae* em perus (Huchzermeyer, 1993), *P. lophurae* em galinhas e marrecos (Paraense, 1948), *P. reticulum* em canários (Palinauskas *et al.*, 2008) e em pardais, *Passer domesticus* (Loiseau, 2011). *Plasmodium gallinaceum* foi descrito por Brumpt, que também realizou as primeiras infecções experimentais em galinhas pela inoculação de esporozoítos via picada de mosquito (Brumpt, 1936 a,b).

A malária tem mecanismos patogênicos multifatoriais, pois podem estar envolvidos fatores relacionados à anemia, inflamação, coagulopatias e alterações neurológicas, embora fatores relacionados à espécie do parasito e ao hospedeiro possam influenciar no desenvolvimento da doença (Hansen, 2012). Na malária, há produção de grande quantidade de citocinas e quimiocinas, que tem efeito inflamatório e estão relacionadas à piora do quadro infeccioso (Shi-Ichi *et al.*, 2013).

O óxido nítrico (NO) tem papel controverso durante o cenário da infecção malárica. Em humanos, estudos apontam para um papel benéfico em virtude de sua ação microbicida frente ao patógeno. Por outro lado, outros trabalhos demonstram que o NO está envolvido com a exacerbada inflamação (Schofield e Grau, 2005) e desenvolvimento de formas cerebrais fatais (Mendis e Carter, 1995; Mackintosh *et al.*, 2004). Em experimentos desenvolvidos com galinhas infectadas

com *P. gallinaceum*, foi demonstrado que NO está implicado na resposta imune nessa infecção, indicando ativação do sistema imune. Os autores observaram que macrófagos derivados de monócitos destes animais produzem maiores quantidades de NO em cultura (Macchi *et al.*, 2010).

A infecção malárica em aves como modelo de malária humana foi bastante explorada entre 1890 e 1940 (Paraense, 1946; Slater *et al.*, 2005), mas teve menor interesse após o avanço do modelo murino (Aviado, 1969). Entretanto, esse modelo tem retomado sua importância, com o aumento das pesquisas em aves (Nagao *et al.*, 2008). O modelo de infecção aviária por *P. gallinaceum* tem algumas vantagens, dentre elas: a) está mais próximo filogeneticamente a *P. falciparum* (McCutchan *et al.*, 1996; Leclerc *et al.*, 2004), b) a cepa é facilmente mantida em laboratórios e biotérios, c) é caracterizada por grandes parasitemias e d) pode infectar hospedeiros de várias espécies de aves (Nagao *et al.*, 2008).

Como citado acima, a malária aviária é um bom modelo de estudo, pois assim como a malária humana, tem o NO envolvido no contexto infeccioso. Desta forma, no presente estudo, a produção de NO foi suprimida através da inibição da óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Essa supressão foi realizada através da inoculação de aminoguanidina (AG), um inibidor da iNOS (Khan *et al.*, 1997). Parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos, plasmáticos e histopatológicos foram aferidos. Nos animais tratados houve diminuição das alterações fisiopatológicas, assim como da mortalidade. Portanto, infere-se nesta pesquisa que a inibição de NO é benéfica no modelo de infecção aviária por *P. gallinaceum*.

2 Revisão de Literatura

2.1 Gênero *Plasmodium*

As análises moleculares identificaram aproximadamente 200 espécies do gênero *Plasmodium* que infectam homem e outros mamíferos, aves e répteis (Nishimoto *et al.*, 2008). *Plasmodium* é o único gênero da família Plasmodidae, sub ordem Haemosporina e tem 10 sub-gêneros. O gênero *Plasmodium* compreende parasitos intracelulares de dois hospedeiros, um intermediário onde ocorre a reprodução sexuada, e o outro invertebrado, onde há a reprodução sexuada (Garnham, 1966).

O gênero *Plasmodium* compreende microrganismos que geram prejuízos à saúde humana (Milner *et al.*, 2013) e animal (Macchi *et al.*, 2010). Vashist *et al.* (2011) chamam atenção para possíveis perdas econômicas pela malária aviária. A introdução do parasito em áreas onde não há endemicidade pode acarretar sérios problemas ecológicos. A extinção do pássaro *Hawaiian honeycreepers* foi atribuída principalmente à introdução de *P. relictum* e do seu vetor *Culex quinquefasciatus* no Havaí (Atkinson, 2000).

2.1.1 Ciclo de Vida

Em relação ao homem, o ciclo de vida (Figura 1) se dá quando o mosquito pica o hospedeiro, e inocula formas parasitárias no estágio de esporozoita, que se dirige ao fígado e infecta o hepatócito (Plassmeyer *et al.*, 2009). O parasito tem facilidade na adesão e posterior penetração ao hepatócito por ter uma proteína chamada circunsporozoita de grande afinidade com receptores glicosilados desta célula. O ciclo hepático, extraeritrocítico, dura entre 5 e 16 dias, dependendo da espécie. Há formação de merozoítas, que rompem o hepatócito, alcançam a corrente sanguínea, e infectam eritrócitos iniciando o ciclo eritrocítico. Os merozoítas formam trofozoítas e esquizontes maduros, que rompem e liberam merozoítas que continuam a infectar hemácias (NIAID, 2012).

O único momento em que o merozoita é exposto ao sistema imune do hospedeiro é na fase pós hemólise, um breve momento em que fica livre no plasma sanguíneo. Após hemólise, a baixa concentração de potássio plasmático acarreta aumento da concentração de cálcio no citoplasma do parasito, estimulando a secreção da organela conhecida como micronema, que libera adesinas e invasinas

na superfície do merozoito (Singh *et al.*, 2010). Os dois seguintes passos são a adesão e reorientação do parasito em eritrócitos, e a formação de uma junção móvel entre as duas células. A adesão e a orientação na superfície da hemácia são decorrentes da secreção de proteínas dos micronemas. Após isto, com orientação do citoesqueleto, há penetração ativa do parasito e início da formação do vacúolo parasitóforo, com participação das proteínas das róptrias, outra organela secretora do parasito. O próximo passo é a pós-invasão, quando a parede do vacúolo parasitóforo é terminada com participação das proteínas secretadas pelos grânulos densos, a terceira organela secretora do parasito (Cowman *et al.*, 2012).

Uma parte de merozoitas se diferencia nos eritrócitos em formas reprodutivas: gametócitos masculino e feminino. Quando o mosquito faz o repasto sanguíneo, ingere hemácias parasitadas, que são rompidas no intestino do mosquito. Os gametas fundem-se e formam o zigoto diploide, que gera oocinetos que se movimentam, penetram na parede do intestino e formam oocistos voltados para a hemolinfa do mosquito. Após 8-15 dias, termina o crescimento e divisão dos oocistos, com liberação de centenas de esporozoitas na cavidade geral do mosquito. Quando os esporozoitas alcançarem a glândula salivar, o mosquito poderá inocular o parasito, fechando-se o ciclo (NIAID, 2012; Cowman *et al.*, 2012).

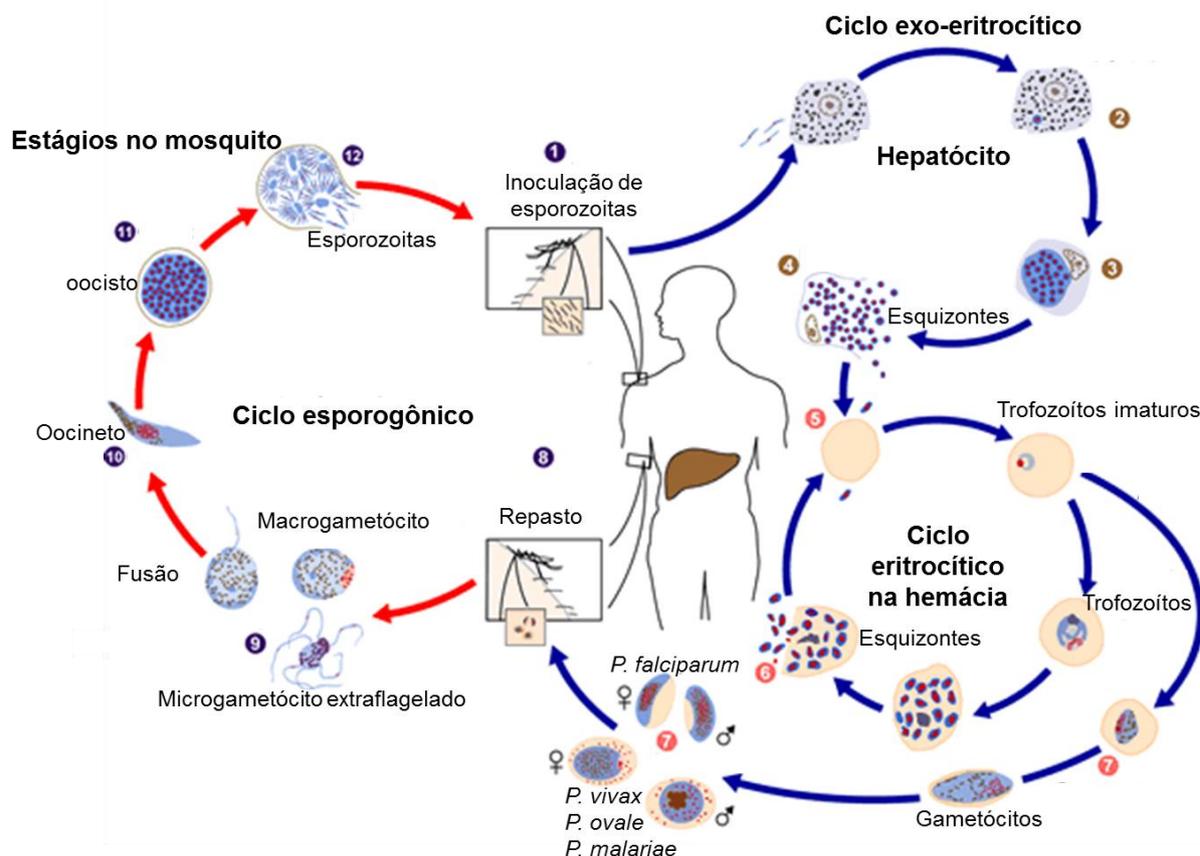


Figura 1: Ciclo evolutivo das malárias humanas. Fonte: França et al., 2008. Adaptado de CDC, 2014.

3 Fisiopatologia Malárica

As malárias são doenças multifatoriais, tendo as infecções por *Plasmodium* caráter sistêmico, acometendo vários órgãos. Classicamente, são atribuídas às malárias complicações de ordem hemolítica, coagulativa e inflamatória (Ghosh e Shetty, 2008).

3.1 Anemia

A anemia é em grande parte decorrente da hemólise, mas apesar de haver uma correlação direta com a simples ruptura da hemácia, ainda não há um completo entendimento deste mecanismo, pois é multifatorial. A perda de hemácias envolve destruição eritrocítica, remoção de eritrócitos parasitados e diminuição da eritropoiese. Citocinas inflamatórias e moléculas parasitárias podem ter ação na inibição da eritropoiese (Haldar e Mohandas, 2009).

Hemólises intravasculares e extravasculares estão diretamente implicadas na patogênese, principalmente na malária aguda, estando relacionadas aos ciclos hemolíticos (Ekvall *et al.*, 2001). A hemólise intravascular está diretamente relacionada a danos hepáticos pelo acúmulo da fração heme de hemoglobina e estresse oxidativo (Dey *et al.*, 2012). Quando a hemólise é muito extensa, a hemoglobina plasmática aumenta tanto que ultrapassa o limiar de captação da haptoglobina. A hemoglobina é oxidada e frações livres de heme e globina são formadas (Tolosano *et al.*, 2002). Os picos febris observados na malária entre períodos de temperatura normal estão relacionados à ruptura cíclica dos eritrócitos pelos merozoitos, com liberação de substâncias pirógenas (Miller *et al.*, 2013).

Após penetração na hemácia, o merozoito modifica o ambiente intracelular para facilitar seu crescimento. PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane proteins 1) é secretada pelo parasito e é recrutada para a superfície externa da membrana plasmática do eritrócito. Por PfEMP1 induzir aderência de eritrócitos ao leito vascular, essa estratégia parasitária evita a microcirulação esplênica e consequente hemocaterese, aumentando o tempo de permanência dos eritrócitos infectados na circulação sanguínea. Trata-se de um acontecimento agravador da patogênese, pois além de predispor vasculites, a aderência pode obstruir a microcirculação, gerando hipóxia e acidose láctica tecidual (Miller *et al.*, 2013). As aderências vasculares de eritrócitos geram sinais que estimulam mais adesão, coagulação e inflamação, além de alterar a integridade da barreira endotelial e vasoregulação (Dondorp *et al.*, 2008). Micropartículas plaquetárias se ligam a eritrócitos parasitados, transferem proteínas para a superfície da hemácia e aumentam a capacidade dos eritrócitos de aderirem ao leito vascular, isso leva a consequente perda eritrocítica (Angchaisuksiri, 2014).

Segundo Buffet *et al.* (2011), a ação esplênica tem grande importância na anemia, pela intensa hemocaterese que este órgão realiza neste infecção, retendo tanto hemácias parasitadas quanto hemácias não parasitadas, embora modificadas estruturalmente. Os autores chamam a atenção para o fato de que pacientes em primo-infecção apresentam maior retenção de hemácias na microcirculação quando comparados com infecções recorrentes. Há uma teoria relacionada à coevolução *Plasmodium*/hospedeiro envolvendo o baço. Nesses pacientes em primo infecções ocorre maior anemia, entretanto, há retenção do parasito no baço, com possível prevenção de malária cerebral (MC) (Buffet *et al.*, 2009).

Anemias não necessariamente estão relacionadas com altas parasitemias. Entretanto, alta parasitemia causa hemólise profunda com implicações na patogênese. Na malária humana, *P. falciparum* causa os piores quadros de hipoglicemia, MC, acidose metabólica e complicações pulmonares. Uma das implicações para isto é que nas infecções por *P. falciparum* grandes parasitemias são observadas, pois parasita ampla gama de eritrócitos em distintos estágios de maturação, fato que não ocorre com outros parasitos do gênero no homem (Chotivanich *et al.*, 2000).

3.2 Inflamação: envolvimento do sistema imune na malária

O papel dos linfócitos no desenvolvimento da MC ocorre de forma interligada. Nos estágios sanguíneos da malária murina, interferon gamma (IFN- γ) tem importante fator protetivo e é produzido em grande parte por linfócitos da subpopulação $\gamma\delta$, ativando a resposta celular que pode eliminar o parasito. O linfócito $\gamma\delta$ expressa o receptor CD40 e ativa células dendríticas, culminando em efetivo combate ao parasito (Shi-Ichi *et al.*, 2013).

Processos inflamatórios estão envolvidos no início do desenvolvimento da MC, quando há perda da proteção da barreira hematoencefálica. Na malária murina, o linfócito TCD8⁺ está implicado como carreador deste processo através da indução de apoptose das células endoteliais por mecanismos dependentes de perforinas (Potter *et al.*, 2006). Desta forma, quebrada a barreira hematoencefálica, esses linfócitos penetram no parênquima cerebral, e são liberadas citocinas inflamatórias e antígenos parasitários (Hunt *et al.*, 2006). Neste momento, IFN- γ é bastante maléfico, já que a depleção de linfócitos $\gamma\delta$ T previne o desenvolvimento de MC em camundongos susceptíveis (Yañes *et al.*, 1999). Ainda neste cenário, células dendríticas CD8 α ⁺ induzem destruição tecidual, pois apresentam antígenos para linfócitos T $\alpha\beta$ citotóxicos, que causam lesão local (Lundie *et al.*, 2008). Linfócitos CD4⁺ $\alpha\beta$ produzem no local elevadas concentrações de IFN- γ , que recruta grande quantidade de linfócitos CD8⁺ $\alpha\beta$ (Villegas-Mendez *et al.*, 2012), que causam danos teciduais através de mecanismos relacionados com perforinas (Potter *et al.*, 2006).

O fato de que para cada célula parasitada oito não parasitadas são captadas na infecção por *P. falciparum* (Jakeman *et al.*, 1999) e 34 na infecção por *P. vivax* (Collins *et al.*, 2003) resume bem a complexidade das anemias maláricas, pois elas

não são oriundas somente de hemólises. Aderências vasculares e captação de hemácias não parasitadas no baço tem um fator imune envolvido (Kai e Roberts 2008). A deposição de anticorpos e proteínas do sistema complemento nas hemácias não parasitadas gera aumento de sua captação pelos macrófagos, contribuindo para a anemia. Redução da expressão dos receptores CR1, CD55 e CD59 causados pela infecção estão associados com o aumento da susceptibilidade de anemia na malária em crianças. Os receptores CD35 e CD55 são responsáveis por bloqueio da formação de complemento C3a, o que diminui drasticamente a fagocitose de hemácias não parasitadas (Kai e Roberts 2008).

Células dendríticas fagocitam muitas hemácias parasitadas e apresentam antígenos para linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Células *natural killer* (NK) ativam células dendríticas CD8⁺, que estimulam linfócitos TCD8⁺ virgens. Esse processo é alimentado por interleucina (IL) 12 secretado por células dendríticas, que catalisam robusta ativação de células NK (Lundie *et al.*, 2008). As células *natural killer* T (NKT) CD1 produzem grande quantidade de IFN- γ , que ativa monócitos e macrófagos, polarizando uma resposta imune Th1. Os macrófagos fagocitam muitas células parasitadas e a consequência disto é a secreção de outras citocinas inflamatórias, que tem ação sistêmica, levando a lesões do endotélio. A lesão endotelial gera um efeito cascata, pois aumenta a produção de micropartículas plaquetárias que por sua vez favorece a aderência de mais hemácias parasitadas no leito vascular (Hansen, 2012).

A proteína inflamatória de macrófagos (MIP) é considerada um marcador sérico de inflamação. MIP é uma quimiocina produzida por muitos tipos celulares, mas principalmente macrófagos, células dendríticas e linfócitos. Essa citocina tem efeitos quimiotáticos e pró inflamatórios (Mauer e Von Stebut, 2004). Recentemente demonstrou-se que a hemozoina fagocitada por macrófagos gera estímulos para produção de MIP-1. Ademais, a fagocitose de hemozoina também induz produção de matriz metaloproteinase 9 (MMP-9), que por sua vez pode induzir produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-1 (Giribaldi *et al.*, 2011). Macrófagos que fagocitam hemozoina produzem mais MMP-9 e citocinas relacionadas com ativação persistente da via fator de transcrição nuclear kappa B (NF-KB) (Prato *et al.*, 2010).

Na malária causada por *P. vivax* há forte componente inflamatório envolvido, com aumento de citocinas inflamatórias e supressão de citocinas regulatórias,

aumento dos níveis de proteína C reativa, aumento de TNF- α e IFN- γ séricos. Também está no contexto o desbalanço entre IFN- γ /IL10, com o agravamento da infecção (Andrade *et al.*, 2010).

Infecções causadas por *P. falciparum* geram altas parasitemias, icterícia e choque hemodinâmico, sendo estes três significativamente relacionados a altos níveis de IL-6, IL-10 e IFN- γ . Paradoxalmente, o coma está relacionado à queda destas três citocinas séricas. A elevação e desbalanço de citocinas inflamatórias estão relacionadas ao desenvolvimento de agravamento da patologia sistêmica, mas não obrigatoriamente do sistema nervoso central (SNC) (Day *et al.*, 1999).

Há uma correlação entre a hemólise e aumento de citocinas inflamatórias plasmáticas. A fração heme de hemoglobina induz a produção de TNF- α pelas células de defesa, que por sua vez pode regular a via de NF- κ B. A ativação da via do NF- κ B está bastante relacionada com inflamação malárica e injúria hepática, com ativação do sistema imune e infiltração neutrofílica no fígado. O aumento da expressão de NF- κ B induz produção de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) e MIP-2, que são quimioatrativos para neutrófilos (Dey *et al.*, 2012).

3.3 Óxido Nítrico e Malária

Há três isoformas de NO sintase (NOS) formadoras de NO. A óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS1) é encontrada em neurônios, enquanto a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS3) é expressa nos endotélios. Ambas estão constitutivamente presentes nesses tipos celulares. Essas enzimas são ativadas pelo aumento da concentração de cálcio intracelular e produzem NO. A terceira isoforma desta enzima é a iNOS ou NOS2, que tem função na imunidade e inflamação. A maioria das células pode expressar iNOS após estímulo específico basicamente por citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF- α , IFN- γ e lipopolissacarídeo de membrana bacteriana (LPS) (Korhonen *et al.*, 2005). A iNOS difere das duas anteriores por ser cálcio independente, o que a torna ativa por longos períodos logo após sua expressão. Está mais relacionada com a imunidade, sendo produzida particularmente por macrófagos por estímulos citocínicos (Bogdan, 1998).

A resposta imune celular durante a malária é capitaneada em grande parte pela produção de IFN- γ , TNF- α e aumento da expressão de iNOS, tendo o NO como fator microbicida (Sharma *et al.*, 2004) e imunomodulador importante na

malária. O glicosilfosfatidilinositol (GPI) malárico tem ação estimuladora sobre receptores tipo toll 2 (TLR2), induzindo citocinas inflamatórias através da via NF- κ B (Miller *et al.*, 2002).

Óxido nítrico foi frequentemente implicado como potencializador das complicações maláricas, causando estresse oxidativo e lesão na membrana da hemácia, predispondo a hemólises e alteração da sinalização neuronal (Sobolewski *et al.*, 2005). Foi proposto que a combinação de hipóxia tecidual e de citocinas inflamatórias estimulam grande produção de iNOS e, desta forma, NO. Neste caso, iNOS catalisaria formação de NO próximo do vaso que tem acesso ao tecido encefálico, lesando-o e predispondo MC (Clark e Cowden, 1999). Entretanto, a participação de NO na malária é bastante controversa, pois em muitos casos não complicados se verifica aumento de NO plasmático enquanto em outros, mais complicados, pode-se observar baixos níveis de NO. Desta forma, mais do que a mensuração do NO plasmático, faz-se necessária uma análise no local da lesão (Miller *et al.*, 2002).

Pesquisas apontam para autorregulação da manutenção dos níveis de NO plasmático durante a malária. Após hemólises, é liberada hemoglobina, arginase e ADMA (dimetil arginina assimétrica) no plasma e esses três fatores influenciam na queda de NO. A hemoglobina reage com NO vascular e o converte a nitrito, enquanto que arginase metaboliza arginina em ornitina, diminuindo o substrato para iNOS. Por último, ADMA pode inibir iNOS através da ROS kinase endotelial (Miller *et al.*, 2013). Entretanto, não se pode inferir que a hemólise pode acarretar algum bem. É da hemólise que provém os altos níveis da fração heme de hemoglobina, que causa lesão direta no tecido e nos vasos, desta forma facilitando a invasão parasitária (Kumar e Bandyopadhy, 2005).

3.4 Coagulopatia

Há uma ligação entre inflamação e coagulopatia em malária (Miller *et al.*, 2013). Hemácias infectadas estão implicadas com a coagulopatia malárica, pois ao interagirem com o leito vascular, induzem no local a ligação de fatores de coagulação, que ativam o sistema trombina, que por sua vez estimula formação de fibrina (Miller *et al.*, 2013). Leucócitos em rolamento no leito vascular e citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, têm ação direta sobre as células endotélias e estimulam

a expressão dos fatores teciduais, que induzem a formação de trombina, agregação plaquetária e conversão de fibrinogênio a fibrina (Clark *et al.*, 2006).

Na malária, a trombina também catalisa inflamação, além de contribuir para a perda da permeabilidade vascular (Francischetti *et al.*, 2007). A trombina é responsável pelo aumento de expressão de receptores de proteases. Proteínas G podem se ligar a estes sítios e estimular secreção de citocinas inflamatórias e moléculas com propriedades adesivas, que podem piorar a coagulopatia (Miller *et al.*, 2013).

A trombocitopenia por si só não tem caráter de grande malignidade, mas grandes complicações são notadas se estiver acompanhada de coagulação intravascular disseminada (CID). Em coagulopatias, a trombocitopenia é um achado esperado. A queda das contagens trombocíticas ocorre por aumento de consumo, sequestro esplênico e diminuição da produção medular (de Mast *et al.*, 2010). Ao contrário de *P. falciparum*, *P. vivax* normalmente desenvolve parasitemias imunomediadas, sendo poucos os relatos envolvendo CID (Mohapatra *et al.*, 2013). Citocinas inflamatórias, particularmente TNF- α secretadas por monócitos na infecção malárica, induzem a expressão de grande quantidade de moléculas e proteínas, como ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1, p-selectina, trombomodulina e MCP-1, que favorecem aderência de hemácias e leucócitos no leito vascular, agravando os efeitos da coagulação (Clark *et al.*, 2006).

A plaqueta não é uma célula de comportamento passivo na infecção malárica. Existem receptores glicoproteicos na superfície de hemácias chamados *Duffy*, que tem secreção aumentada na inflamação, e serve de sítio de ligação para *Plasmodium*. Plaquetas através de seu receptor CD36 ligam no antígeno PfEMP-1 localizado na superfície da hemácia parasitada. As plaquetas descarregam o conteúdo de seus grânulos, contendo PF4 (*Platelet Factor 4*) no interior da hemácia parasitada. Após isto, o complexo PF4/antígeno de *Duffy* é carregado para dentro da célula, ligado ao parasito e exerce atividade microbicida (Angchaisuksiri, 2014).

4 *Plasmodium gallinaceum*

P. gallinaceum foi descrito pela primeira vez na Indochina, por Brumpt, que fez a primeira infecção experimental em galinha e observou doença (Paraense, 1946). Dentre as espécies utilizadas nas experimentações, é a que mais se

aproxima filogeneticamente de *P. falciparum*, que causa a malária humana mais fatal (McCutchan *et al.*, 1996; Leclerc *et al.*, 2004). A galinha silvestre (*Gallus gallus*), em que se identificou as formas parasitárias é relativamente resistente a infecção por *P. gallinaceum*, entretanto, a galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) é altamente sensível (Permim e Juhl, 2002).

4.1 Vetores

Nos primórdios dos estudos com *P. gallinaceum*, ficou bastante claro que *Aedes aegypti* era um ótimo vetor para esse *Plasmodium*, pois a eficácia de transmissão após repasto de sangue contendo gametócitos era de 100% (Brumpt, 1936a,b). Paraense (1945) obteve grande sucesso na transmissão por *A. lepidus*, mas mencionou o risco de trabalho com *Aedes* spp sem os devidos cuidados e estrutura. Mosquitos do gênero *Culex* (Wiedling, 1941) e *Anopheles* (Alavi *et al.*, 2003) são bons transmissores de *P. gallinaceum*.

4.2 Ciclo de Vida do *Plasmodium gallinaceum*

O ciclo de vida do *P. gallinaceum* é bastante diferente das malárias humanas no que diz respeito à fase exoeritrocítica (Fig. 2). Após a picada do mosquito, esporozoítas inoculados infectam macrófagos locais e se diferenciam em criptozoítos, realizando o primeiro ciclo exoeritrocítico. Os criptozoítos podem seguir replicando no local ou infectar macrófagos em outros locais, onde se converterão a metacriptozoítos. Os metacriptozoítos podem se diferenciar em fanerozoítos e seguir para o segundo ciclo exoeritrocítico nos tecidos, ou se diferenciar em merozoítos, que darão origem à fase eritrocítica, no sangue. Porém, posteriormente, merozoítos poderão formar novos fanerozoítos e dar continuidade na replicação tecidual, inclusive nos endotélios incluindo os cerebrais (Huff e Coulston, 1944; Garnham, 1966).

Os merozoítas que desencadeiam a fase eritrocítica se diferenciam em trofozoítas, que podem gerar vários merozoítas ou se diferenciam em gametócitos masculino e feminino. Após o repasto sanguíneo pelo mosquito, os gametócitos se fundem e formam oocistos. Após esporogonia, os esporozoítas são liberados dos oocistos, alcançam as glândulas salivares, podendo o mosquito inocular o parasito no próximo repasto completando o ciclo (Garnham, 1966).

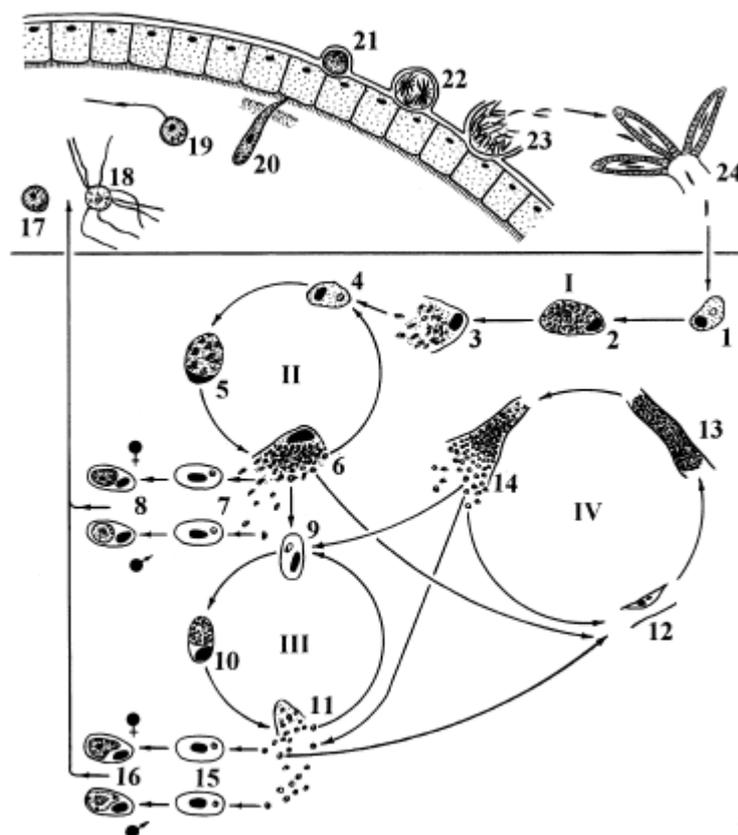


Figura 2: Ciclo biológico do gênero *Plasmodium* em aves. I e II, merogonia exoeritrocítica primária; III – merogonia eritrocítica; IV – merogonia exoeritrocítica secundária. 1 – esporozoito no macrófago; 2 e 3 – criptozoítos; 4 – merozoítos; 5 e 6 metacriptozoítos; 7- merozoítas nas hemácias; 8 – gametócitos; 9 – merozoítas nas hemácias; 10 e 11 – merontes hemáticos; 12 - merozoítas nos capilares; 13 e 14 – fanerozoítos; 15 – merozoítos hemáticos; 16 – gametócitos; 17 – macrogametócitos; 18 – exflagelação de microgametas; 19 – fertilização de macrogametas; 20 – oocineto que penetra na membrana peritrófica; 21 – oocisto; 22 e 23 – esporogonia; 24 – esporozoito na glândula salivar. Fonte: Valkiunas, 2005.

4.3 Patogenia da infecção por *Plasmodium gallinaceum*

O aumento da parasitemia após infecção de aves por *P. gallinaceum* e consequente hemólise foi implicado como uma das principais causas de óbito do hospedeiro vertebrado décadas atrás (Garnham, 1966). A isto, atribui-se a destruição de eritrócitos em escala muito maior a que a medula pudesse repor (Zuckerman *et al.*, 1969). De fato, anemias são recorrentes em estudos com este parasito tanto em trabalhos com inoculação através da picada de mosquito (Paulman e McAllister, 2005) quanto em infecções com eritrócitos parasitados (Swann, 1973). Macchi *et al.* (2010) correlacionam baixos hematócritos com o agravamento de lesão neurológica em galinhas infectadas com hemácias

parasitadas. Segundo Williams (2005), picos parasitêmicos podem estar associados com as maiores quedas do hematócrito na maioria dos animais infectados por *P. gallinaceum*. Nestes casos, a diarreia verde comumente observada é um reflexo da hemólise.

Paulman e McAllister (2005) infectaram galinhas via mosquito e observaram parasitemias, alterações clínicas e anemia, mas nenhuma morte, o que não é um acontecimento comum nas infecções por *P. gallinaceum*. Por outro lado, os autores relatam este acontecimento como sendo mais próximo do ocorrido na natureza, com baixas parasitemias e óbitos menos frequentes. Entretanto, o sucesso de uma infecção com mosquito é diretamente relacionado com as formas parasitárias sanguíneas no momento da picada do animal doador (Rosemberg e Koontz, 1984). Galinhas inoculadas com esporozoítas desenvolvem imunidade após a normalização dos sinais clínicos que persiste por pelo menos 33 dias, pois galinhas re-infectadas tornam-se resistentes (Paulman e McAllister, 2005). Imunidade também é desenvolvida nas infecções realizadas por hemácias parasitadas (Williams, 2005).

Alterações neurológicas foram descritas como protagonista nas causas letais por *P. gallinaceum* (Greenber *et al.*, 1950), e contextualizadas com obstruções de capilares cerebrais em fases iniciais e tardias, em decorrência do ciclo exoeritrocítico nas infecções via mosquito (Garnham, 1966). As formas exoeritrocíticas foram descritas como agentes potencializadores da malária aviária cerebral (Paraense, 1946). Recentemente, foram descritas em galinhas infectadas por *P. gallinaceum* lesões neurológicas com infiltrado inflamatório linfomononuclear e aspecto esponjoso em algumas áreas encefálicas, além de gliose, congestão de capilares e edema. Nesse modelo, foi demonstrado ainda que há ativação do sistema imune inato, que possivelmente está implicado na patogênese da lesão neurológica, com participação de citocinas e do NO (Macchi *et al.*, 2010).

Lesões hepáticas são descritas na infecção por *P. gallinaceum*, e é um dos órgãos onde há maior deposição de formas exoeritrocíticas (Huff, 1957), que causa danos diretos ao tecido (Paraense, 1946). Na infecção natural ou na experimental por picada de mosquito, parte dos parasitos se desenvolve em metacriptozoítos, que multiplicam nas células de Kupffer, causando lesão hepática (Frevert *et al.*, 2008). A inflamação do órgão, com edema e grande quantidade de infiltrados

inflamatórios contribui para a patogênese em nível histopatológico e na necropsia, quando se observa hepatomegalia (Williams, 2005).

Baço de animais infectados por *P. gallinaceum* podem apresentar-se aumentado, tendo como causa hiperplasia e edema (Seed e Manwell, 1977). O baço realiza hemocaterese, retirando do sangue hemácias velhas e lesadas. É desta forma que ocorre o acúmulo de pigmento escuro no órgão, dando o aspecto macroscópico escuro durante a infecção por *P. gallinaceum* (Williams, 2005). Essa coloração reflete o acúmulo tecidual do pigmento hemozoína, que tem propriedades inflamatórias e quimiotáticas (Jaramillo *et al.*, 2004). Além de traçar uma relação direta com alta parasitemia e cargas parasitárias nos órgãos, Swann (1973) relacionou aumento do baço com comprometimento imune nas perdas de hemácias na malária aviária. Ademais, correlacionou o sequestro esplênico de hemácias parasitadas ou opsonizadas como implicância maior que a hemólise na anemia. De fato, neste órgão há uma intensa atividade imune decorrente da malária aviária por *P. gallinaceum* (Taliaferro e Taliaferro, 1955).

Segundo Macchi *et al.* (2010), as alterações clínicas acompanhadas da malária aviária estão relacionadas ao aumento da parasitemia, sendo as mais comuns a palidez de pele e mucosas, anorexia e febre, além de anemia. As doses infectantes estão diretamente relacionadas à agressividade dos sintomas, assim como nas manifestações histopatológicas da infecção por *P. gallinaceum* (Permin e Juhl, 200).

5 Hematologia de galinhas

5.1 Hemácias

As hemácias das aves são ovais e nucleadas, sendo o núcleo oval, de coloração púrpura escura e com um aglomerado de cromatina uniforme. O citoplasma se cora em um róseo alaranjado e tem uma área abundante (Bounous e Stedman, 2000). Em aves, hemácias policromáticas normalmente representam hemácias jovens, estão em baixas contagens e possuem morfologia arredondada (Tadjalli *et al.*, 2013). Hemácias policromáticas podem estar presentes numa porcentagem entre 1 e 5% em aves saudáveis (Martinho, 2012).

Diminuição da contagem de eritrócitos indica anemia, que deve ser correlacionada com a dosagem de hemoglobina. Na anemia severa, pode haver alterações morfológicas no eritrócito com formato arredondado. Hemácias

redondas com núcleo ovalado é um claro indício de maturação sem sincronia devida à acelerada eritropoiese (Dein, 1986; Zinkl, 1986). Da mesma forma, hemácias binucleadas podem ser encontradas após perdas sanguíneas severas acompanhadas de intensa resposta medular. As hemácias das aves têm menor tempo de vida que hemácias de mamíferos, sendo a meia vida de um eritrócito de galinha de 25 a 45 dias (Martinho, 2012).

O hematócrito tem uma variação média de 35 a 55%, sendo que valores abaixo indicam anemia e acima, desidratação ou policetemia. O hematócrito pode diferenciar entre sexo e idade, sendo maior nos machos e em aves adultas (Schmidt *et al.*, 2006). O tamanho da hemácia também pode influenciar no hematócrito. Idade, gênero e hormônios e podem influenciar o tamanho das hemácias (Mitchell e Johns, 2008). O CHCM (Concentração de hemoglobina corpuscular média) dá noção da média de hemoglobina existente no interior das hemácias. A diminuição do valor de CHCM está relacionada com a hipocromia e hipocromasia. O tamanho da hemácia da ave é verificado pelo volume corpuscular médio, VCM (Mitchell e Johns, 2008).

5.2 Leucócitos

Leucócitos das aves são bastante responsivos a processos infecciosos e podem variar tanto quantitativamente quanto morfológicamente nas infecções. Os leucócitos das aves são divididos em granulócitos, monócitos e linfócitos. Os granulócitos são classificados desta maneira em virtude de seus grânulos citoplasmáticos, abrangendo heterófilos, eosinófilos e basófilos (Mitchell e Johns, 2008).

5.2.1 Eosinófilos

Os eosinófilos são células que apresentam tamanho idêntico aos heterófilos, mas exibem normalmente núcleo bilobulado e grânulos citoplasmáticos arredondados e muito eosinofílicos. O citoplasma do eosinófilo se mostra azulado. Os grânulos dos eosinófilos das aves contém enzimas lisozima, peroxidase e grande concentração de arginina (Mitchell e Johns, 2008).

As funções detalhadas dos eosinófilos nas aves são obscuras, mas provavelmente tem função no desenvolvimento e hipersensibilidade tipo IV, nas respostas inflamatórias, fagocitose e papel microbicida e parasiticida (Montali,

1988; Rupley, 1999). Bounous e Stedman (2000) descrevem parasitismos como causa de eosinofilia e administração prolongada de corticóides como fatores que desencadeiam eosinopenia.

5.2.2 Basófilo

Basófilos são células pequenas a médias, de núcleo arredondado e com citoplasma preenchido por grânulos basofílicos que podem inclusive dificultar a visualização do núcleo. Colorações a base de álcool podem degranular essas células, levando a diminuição na sua contagem no esfregaço. Não há um completo entendimento da função do basófilo na ave, mas podem estar envolvidos na necrose tecidual, doença respiratória e clamidiose (Rupley, 1999). Seus grânulos contém histamina e por isso pode ter um papel nas alergias, parecido com o basófilo do mamífero (Carlson e Allen, 1969).

5.2.3 Monócitos

Em aves, os monócitos são os maiores leucócitos e tem morfologia parecida com o mamífero, isto é, altamente variável. Pode-se observar desde monócitos com núcleo ameboide até núcleos riniformes. O monócito da ave tem uma área perinuclear mais clara e a partir daí uma coloração mais escura, azul acinzentada, onde podem ser observados pequenos vacúolos e grânulos finos. Monócitos são conhecidos como células de alta capacidade fagocítica (Mitchell e Johns, 2008). Em galinhas, macrófagos derivados de monócitos são a primeira linha de defesa imunológica por seu papel microbicida e de apresentação de antígenos para os linfócitos. Através de citocinas e produtos bacterianos, podem ser estimulados a produzir grandes quantidades de NO através de iNOS (Hussain *et al.*, 1996).

5.2.4 Linfócitos

Linfócitos T de aves são produzidos na medula e maturados no timo. Linfócitos são células redondas, com alta proporção núcleo:citoplasma com núcleo apresentando cromatina densa e citoplasma escasso e levemente basofílico, sem vacúolos. Pouco frequentemente, podem apresentar grânulos citoplasmáticos azurofílicos e pequenas projeções citoplasmáticas. Em infecções podem ser vistos

linfócitos reativos, que tem núcleo com cromatina bastante densa e citoplasma com basofilia intensa (Mitchell e Johns, 2008).

Os linfócitos T de galinhas apresentam receptores CD3 em sua superfície, enquanto linfócitos Th são tipicamente portadores de CD4, ambos com funções na imunidade celular e na implantação da imunidade humoral. Linfócitos Th ativam macrófagos e estimulam linfócitos B a multiplicar e diferenciar. Células NK são identificadas como portadoras de receptores CD8 e tem como principal função a lise de células infectadas e tumorais (Erf, 2004). Linfócitos T de galinhas apresentam resposta a antígenos e pode desenvolver robusta produção de citocinas inflamatórias, que leva a ativação de macrófagos que carregam forte resposta celular (Kim *et al.*, 2000). Na imunidade de mucosa linfócitos $\gamma\delta$ T e células NK são as duas principais subpopulações linfocíticas no epitélio intestinal de galinhas, e provavelmente tem função destacada na imunidade local (Goebel *et al.*, 2001).

Linfócitos B de aves são produzidos na medula e maturados na bursa de Fabricius. Podem ser vistos como células grandes com citoplasma expandido. Quando essas células possuem grânulos azurofílicos citoplasmáticos estão reativos (Mitchell e Johns, 2008).

5.2.5 Heterófilos

O citoplasma dos heterófilos pode ser incolor ou apresentar diferentes grânulos dependendo do corante utilizado. O núcleo de heterófilos é bi ou trilobulado, com arranjo grosseiro de cromatina de aparência púrpura (Mitchell e Johns, 2008). Em galinhas os heterófilos são desprovidos de catalase, fosfatase alcalina e mieloperoxidase, necessários para a produção de radicais de oxigênio (Segal, 2005). Portanto, essas células produzem radicais de oxigênio e peróxido de hidrogênio por outra via. Desta forma, sua atividade microbicida se dá principalmente através da ação de hidrolases, lisozima e catepsina (Harmon, 1998).

O heterófilo é o principal granulócito envolvido em processos inflamatórios em aves (Mitchell e Johns, 2008). Heterófilos tem função parecida com os neutrófilos de mamíferos, tendo função similar nos tecidos e como célula do sistema imune (Topp e Carlson, 1972). Neste contexto de similaridade, foi demonstrado que assim como os neutrófilos, os heterófilos pode produzir NETs (*neutrophil extracellular traps*), que é a liberação do DNA histonas e elastase com

ação microbicida (Chuammitri *et al.*, 2009). Heterófilos de galinhas normais podem realizar funções como aderência, responder a agentes quimiotáticos, fagocitam e exercer atividade microbicida. Entretanto, após estímulo prolongado frente a bactérias, pode perder atividade por exaustão (Andreasen *et al.*, 1991). Em infecções graves, podem apresentar granulações tóxicas. Além da toxicidade granular, heterófilos tóxicos podem ter citoplasma vacuolado, basofilia citoplasmática e degranulação nuclear. Quanto maior o grau de toxicidade, pior o prognóstico, pois mais agressivo é o processo infeccioso (Latimer e Bienzle, 2000). A toxicidade pode ser classificada como baixa, média e moderada, correlacionada com inflamação e doença sistêmica (Latimer *et al.*, 1988)

6 Justificativa

A malária é a principal causa infecciosa de óbitos humanos, um terço da população mundial reside em área de risco. A cada ano, surgem 219 milhões de novos casos, com 660 mil mortes em 2012 (OMS, 2013). *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (Miller *et al.*, 2002) e *P. knowlesi* (Singh *et al.*, 2004) são agentes etiológicos da malária humana. Apesar desta situação dramática e com todo o avanço científico, ainda há muitas lacunas a serem preenchidas no conhecimento dessa doença.

Hemólise, aderências vasculares, participação do sistema imune e inflamação (McQueen e McKenzie, 2008) além de distúrbios de coagulação (Chapman *et al.*, 2012) estão implicados na patogênese da malária. Segundo Idro *et al.* (2007), a MC é uma complicação destes fatores, que combinados, gera um quadro muito grave e frequentemente letal. Segundo Mackintosh *et al.* (2004), NO tem participação no desenvolvimento da MC no homem.

O NO tem papel controverso no desenvolvimento da infecção. Se por um lado tem função microbicida em relação ao parasito (Naotunne *et al.*, 1993), por outro é implicado no agravamento da doença em virtude de sua atividade inflamatória, que causa vasodilatação (Schofield e Grau, 2005). Entretanto, no modelo murino observou-se que a liberação de moléculas oriundas da hemólise também pode gerar alteração neurológica por lesão da microcirculação (Cabrales *et al.*, 2010). Neste caso, as lesões não seriam causadas por inflamação, e sim por grande vasoconstrição e conseqüente restrição do fluxo sanguíneo, com extensas lesões cerebrais (Cabrales *et al.*, 2010). Em galinhas, macrófagos derivados de monócitos isolados do sangue de aves em alta parasitemia são mais facilmente ativados e produzem mais NO que animais não infectados ou em fase crônica. Desta forma, NO parece ter participação na dinâmica da doença aguda nesta ave (Macchi *et al.*, 2010).

O modelo de infecção malárica em aves teve redução em seu uso desde a descoberta do modelo murino em 1948 (Vincke e Lips, 1948). No entanto, esse modelo voltou a ser estudado recentemente tanto em pesquisas fora (Permim e Juhl, 2002; Frevert *et al.*, 2008) quando dentro do país (Silveira *et al.*, 2009; Macchi *et al.*, 2010). O modelo aviário oferece vantagens, como obtenção de maior volume de sangue e relação natural entre parasito e hospedeiro, fator não existente nas infecções por *P. falciparum* em macacos e *P. berghei* em camundongos (Paulman

e McAllister, 2005). *Plasmodium gallinaceum* tem ainda relação filogenética mais próxima ao mais letal causador de malária humana, *P. falciparum*, que os demais modelos experimentais (McCutchan *et al.*, 1996; Leclerc *et al.*, 2004).

A infecção malárica gera um quadro sistêmico e multifatorial. Inflamação, hemólises, distúrbios hematimétricos e de coagulação estão envolvidos na patogênese da malária e os mecanismos que causam esses distúrbios não são suficientemente entendidos. O papel do NO segue obscuro. Ressalta-se ainda o valor do modelo de infecção experimental aviário, combinado ao *P. gallinaceum*, como citado no parágrafo anterior. De posse destes argumentos, neste trabalho foi utilizado um inibidor da produção de NO pela iNOS, a AG, visando entender o papel dessa molécula na patogênese da malária aviária causada por *P. gallinaceum*.

7 Objetivos Gerais

Avançar no entendimento do papel do óxido nítrico (NO) produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), através de sua supressão por AG, na malária aviária no modelo *Gallus gallus domesticus* infectado por *P. gallinaceum*.

7.1 Objetivos Específicos

- Relacionar a parasitemia e aspectos clínicos da malária aviária com o NO;
- Estudar as alterações eritrocíticas, com foco na anemia e a implicância do NO;
- Avaliar alterações leucocitárias, tendo em vista que o NO produzido por iNOS tem função imune;
- Observar alterações trombocíticas, uma vez que a coagulopatia faz parte da patogênese malárica e pode estar relacionada com a produção de NO;
- Analisar as implicâncias inflamatórias decorrentes da infecção e a participação do NO.

8 Material e Métodos

8.1 Aspectos éticos da experimentação

Todos os protocolos foram realizados sob as normas éticas e legais brasileiras relacionadas à experimentação animal (Lei 117948). Os procedimentos foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Uenf (protocolo número 100).

8.2 Parasito

Foi utilizada a cepa 8A, *Plasmodium gallinaceum*, cedida pela prof^a Dr^a Antoniana Krettli, do Centro de Pesquisa Renè Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais. Esta cepa é mantida através de sucessivas passagens em galinhas e posterior congelamento em nitrogênio líquido, em 10% de glicerol.

8.3 Animais experimentais

Pintinhos de 1 dia, da raça Hubbard, foram adquiridos de granja comercial localizada no município de Marechal Floriano, Espírito Santo. Os pintinhos foram mantidos com alimentação livre de fármacos coccidiostáticos e água *ad libitum*, em ambiente telado, impossibilitando entrada de possíveis vetores. As duas primeiras semanas de vida são críticas, pois os pintinhos não possuem ainda um centro termorregulador bem desenvolvido e são sensíveis às variações de temperatura. Portanto, o controle da temperatura em granjas é essencial para evitar mortes e queda de produção (Baêta e Souza, 1997). O controle da temperatura foi ajustado em 28-29°C, considerada de conforto nesta idade, através do uso lâmpadas de 60 watts. A temperatura foi controlada diariamente através de um termômetro digital.

Os animais foram observados diariamente para acompanhamento e observações clínicas, de modo a descartar qualquer animal que tivesse desenvolvimento desuniforme. O recinto dos animais foi limpo diariamente.

8.4 Inibição da produção de óxido nítrico *in vivo*

Os animais foram distribuídos em 4 grupos, a saber: G1 – não infectado (n=5); G2 – não infectado tratado com AG (n=5); G3 – infectado não tratado (n=12); G4 – infectado tratado com AG (n=12).

AG bicarbonada (Sigma) foi utilizada para inibir produção de NO. Para obter a forma injetável da AG, 2g foi diluído em 40 mL de água destilada resultando em um depósito de AG no fundo do Becker. O pH foi ajustado para 2 com a adição lenta de aproximadamente 50 gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) sob agitação até a AG diluir completamente. O pH foi ajustado para 7 com a adição de aproximadamente 120 gotas da solução de 1M de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Com esse procedimento, obteve-se solução de 50 mL de AG em pH 7 a 40mg/mL.

Após pesagem dos animais, foi feito inóculo via peritoneal, diariamente, de 25mg/Kg de AG nos grupos tratados. Os animais tratados, infectados e não infectados, foram inoculados com AG dois dias pré-infecção, por via intraperitoneal utilizando seringa e agulha de insulina, em aplicações diárias. Desta forma, no momento da infecção provavelmente já haveria alto nível plasmático de AG. Assim, foi possível analisar o papel do NO na malária aviária, através da inibição de sua produção. O tratamento teve término no 28^o dia pós infecção (dpi).

8.5 Infecção experimental

A amostra contendo o parasito foi descongelada e inoculada em um animal doador de duas semanas de idade. Essa idade foi escolhida, pois o animal é mais resistente, evitando-se mortes súbitas, e permite a obtenção de considerável volume de sangue. A parasitemia foi acompanhada diariamente a partir do quinto dia. Seguindo esse procedimento, são necessário 8-10 dias para serem notadas as primeiras formas parasitárias em esfregaço sanguíneo. A partir do 12^o dia, a parasitemia sobe abruptamente. Com a parasitemia ascendente, em torno de 15-20%, o animal doador foi submetido a um plano profundo de anestesia, em protocolo contendo xilazina (10mg/Kg) e quetamina (50mg/Kg) (Rupley, 1999). Após coleta do sangue por via intracárdica, o animal foi eutanasiados pela aplicação na câmara cardíaca, de 2 mL de 0,2% de cloreto de potássio (KCl) em PBS.

O sangue heparinizado foi coletado para realização do eritrograma. Neste momento foi utilizada a heparina pelo fato de não ter toxicidade celular, e, portanto,

não afetar o parasito. Após a contagem dos eritrócitos totais e tendo o conhecimento prévio da parasitemia, o sangue do animal doador foi diluído em PBS para que alíquotas de 50 μL contivessem 5×10^6 eritrócitos parasitados. No momento da infecção, animais foram dispostos aleatoriamente em gaiolas, obedecendo a uma proporção nos grupos de animais machos e fêmeas. Quando os animais completaram 35 dias de vida, foram feitas as infecções experimentais, através de injeção no músculo da coxa.

8.6 Avaliação Clínica

Os frangos foram observados diariamente a partir do primeiro dia pós-infecção, observando-se atividade, ingestão de água de comida, cor de pele e mucosas, respiração, além de qualquer outra alteração apresentada. Além das alterações clínicas, incluindo o escore corporal e comportamental, foram feitas mensurações diárias da temperatura corporal. A temperatura foi aferida via cloaca, diariamente, aproximadamente às 15hs. Essa padronização foi necessária para evitar possíveis alterações de temperatura relacionadas com ciclos hemolíticos.

8.7 Parasitemia

A parasitemia foi avaliada em esfregaços sanguíneos quantificando eritrócitos parasitados e não parasitados e calculando essa proporção em percentagem (%). A parasitemia foi obtida avaliando diariamente pelo menos 1000 eritrócitos em 10 campos microscópicos, utilizando aumento de 1000X e objetiva de 100X.

A parasitemia foi correlacionada com as alterações clínicas e laboratoriais. Nos dias em que o hemograma foi realizado, a parasitemia foi avaliada através dos esfregaços sanguíneos do sangue total. Nestes casos, o sangue foi coletado na veia da asa. Nos dias em que hemogramas não foram analisados, os esfregaços foram realizados com sangue periférico, coletado através do corte de uma unha, em região onde havia microcirculação. Neste momento, uma gota densa de sangue era utilizada para a se fazer o esfregaço.

8.8 Mortalidade

A mortalidade dos quatro grupos foi monitorada diariamente e associada com manifestações clínicas, parasitemia e temperatura corporal. Sobretudo, correlacionada com a consequente inibição de NO pela AG.

8.9 Análise hematológica

O hemograma é um exame laboratorial de rotina, importante e normalmente usado no início de um estudo de caso clínico. Classicamente esse exame é composto de eritrograma, leucograma e plaquetograma. Nos três exames avalia-se a quantidade e morfologia das linhagens eritróide, leucócitos e trombócitos (Mitchell e Johns, 2008). No caso das aves, as plaquetas são denominadas “trombócitos”, têm função de coagulação sanguínea, e ao contrário dos mamíferos, é uma célula propriamente dita, inclusive nucleada (Grecchi *et al.*, 1980).

Para o hemograma, de cada ave foi coletado 1 mL de sangue em 20 μ L de 10% de ácido-etileno-diamino-tetracético (EDTA) em água destilada, que impede a coagulação através da quelação do cálcio. As coletas começaram no 4^odpi e terminaram no 28^odpi. Os animais dos grupos G1 e G2 (controles) tiveram amostras sanguíneas coletadas a cada 4 dias. Os animais dos grupos G3 e G4 (infectados) foram alocados em 2 subgrupos cada. Esse procedimento objetivou não causar grande estresse nos animais infectados, e desta forma não interferir nos resultados. Apesar de cada indivíduo dos grupos G3 e G4 ser coletado a cada 4 dias, a divisão em dois subgrupos propiciou observação em intervalo de 2 dias nos animais infectados. Desta forma, foi possível analisar a dinâmica da infecção de forma mais detalhada, minimizando erros experimentais.

No eritrograma, foram avaliados número de eritrócitos (hematimetria – He) ($\times 10^6/\mu\text{L}$), hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e concentração de hemoglobina média (Hb). Define-se hematócrito como a % do volume de sangue que é composto por hemácias após centrifugação. O valor do volume médio das hemácias ou VCM é dado em fentolitros (fL). A porcentagem do volume da hemácia que é composta por hemoglobina compreende o CHCM e a concentração de hemoglobina média por volume de sangue é representada pela hemoglobinometria (Hb) em g/dL.

Para a contagem de eritrócitos, o sangue total foi diluído na proporção 1:200 de tampão fosfato salino (PBS) e os eritrócitos foram contados em câmara de

Neubauer. Para a mensuração de hemoglobina, as hemácias foram lisadas pelo método da metahemoglobina, as amostras centrifugadas (1600 xg por 5 min) e posteriormente a análise feita por colorimetria, usando-se *kits* comerciais. O VG foi avaliado após microcentrifugação e leitura em uma régua obtendo valor em %. O CHCM foi obtido pela fórmula $CHCM = Hb/VG \times 100$, o VCM pela fórmula $VCM = VG \times 10 / Hb$.

A fase aguda foi considerada o período em que os animais apresentaram parasitemias crescentes e sinais clínicos observados. Durante a fase aguda da doença, foi avaliado a quantidade e a infecção de eritrócitos jovens; esses valores foram comparados com o controle para avaliação medular frente às hemólises. Avaliou-se pelo menos 300 hemácias de cada esfregaço, para determinar a proporção e infecção de hemácias jovens. Tais hemácias imaturas tem coloração citoplasmática diferenciada, mais basofílica.

O leucograma compreendeu a contagem relativa (%) e total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), e a % de infecção. Além disso, avaliações morfológicas foram realizadas, incluindo o tamanho, impregnação de corante e alteração do formato. A infecção dos leucócitos foi confirmada pela microscopia de polarização realizada no microscópio Axioplan. Nos neutrófilos em particular, foi avaliado o grau de toxicidade na doença aguda. Neutrófilos tóxicos apresentam grânulos contendo substâncias mucóides ácidas que se coram bastante basofílica. Neutrófilos tóxicos em grande quantidade estão relacionados com inflamação, já que seu aumento está correlacionado com altas concentrações de proteína C reativa sérica (Van de Vyver *et al.*, 2010). De cada lâmina de animal controle, em média e alta parasitemia, o grau de toxicidade de 100 neutrófilos foi avaliado e a % calculada.

A avaliação dos trombócitos incluiu sua contagem relativa e total, além da observação de alterações morfológicas como aumento de tamanho, forma típica e alterações nucleares. Como a contagem diferencial de leucócitos e trombócitos em separado se mostrou bastante laboriosa, particularmente em altas infecções, essas células foram contadas juntas na câmara de Neubauer em diluição de 1:100 em PBS acrescidos de 0,01% de azul de cresil brilhante, para facilitar a distinção destes dois tipos celulares. Depois, durante a visualização do esfregaço, foi feita análise da proporção relativa entre leucócitos:trombócitos, para chegar a uma contagem absoluta destas células. Os esfregaços sanguíneos foram corados com Panótico (NewProv).

8.10 Morfometrias de leucócitos e trombócitos

Em virtude do quadro agressivo e disseminado causado por *P. gallinaceum* (Huff *et al.*, 1957), e da conhecida ação pró-inflamatória gerada por pigmentos maláricos (Jaramillo *et al.*, 2004) foi feita uma acurada observação morfológica dos leucócitos. Além das contagens de células e observações morfológicas já citadas, também foi verificado o tamanho de leucócitos e trombócitos. Essas variações podem ocorrer em respostas a agentes infecciosos e estão relacionadas com a ativação dessas células devido a agressividade da doença e inflamação (Latimer *et al.*, 1988). Essas medidas e comparação entre grupos são pertinentes, já que foi usado um inibidor da produção de NO, que tem função imune e na fisiologia vascular. Nas observações morfológicas, foi observado aparente aumento do tamanho de monócitos, linfócitos e trombócitos no curso da infecção. Com esse propósito, 200 imagens de monócitos, linfócitos e trombócitos de esfregações de animais controle (n=5), de parasitemia baixa (15%) (n=5) e alta ($\geq 50\%$) (n=5) foram obtidas em microscópio Zeiss Axioplan, equipado com programa Axiovision e câmera MRc5. No programa Axiovision, as imagens obtidas das células foram usadas para calcular suas áreas. Posteriormente, foram comparadas as áreas médias e desvio padrões das células medidas.

8.11 Bioquímica Sérica

A função hepática e renal dos animais experimentais foram avaliadas. Para esses testes, foram coletados 2 mL de sangue sem anticoagulante. Em cada coleta, foi processado amostras de três animais do grupo G1, três do grupo G2, seis do grupo G3 e seis do grupo G4. As amostras de sangue foram mantidas em temperatura ambiente por 40 min para coagulação, e centrifugadas (1600 xg por 5 min). Os soros foram alicotados e armazenados em temperatura de -70 °C, até a realização das análises.

Para função hepática, avaliou-se a atividade das enzimas alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e concentração de colesterol. Como testes de função renal, foram mensurados ureia, creatinina e ácido úrico (Minias *et al.*, 2013). As amostras foram processadas através de *kits* (Labtest Diagnostica SA) e analisadas em espectrofotômetro (BTS310 BloSystems).

8.12 Histopatologia

Para observação direta da lesão nos órgãos, frangos foram eutanasiados na fase aguda da infecção, com parasitemias entre 30-40%, assim como controles não infectados. Animais crônicos, 2 meses pós-infecção, com 0,5% ou menos de parasitemia também foram eutanasiados. Fígado, baço e cérebro foram coletados e fixados em formaldeído 10% tamponado. Procedimento de rotina histológica foi realizada, com desidratação em álcool e xilol, montagem em bloco de parafina e cortes de 5µm em micrótomo. As lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina e avaliadas em aumentos de 400 e 1000X. Além da microscopia de luz de campo claro, foi utilizada a microscopia de polarização, possibilitando a observação de pigmentos maláricos que são birefringentes. Como tais pigmentos são oriundos do metabolismo do parasito e tem propriedades pró-inflamatórias (Jaramillo *et al.*, 2004), pretendeu-se correlacionar sua deposição nos órgãos com a patogenia da doença aguda. As microscopias foram procedidas em microscópio Zeiss Axioplan.

8.13 Quantificação de NO plasmático

A quantificação de NO se deu de forma indireta, pelo método de Griess, através da mensuração de nitrito na solução em uso (Green, 1982). Plasma foi diluído em tampão e incubado com nitrato redutase para a conversão do nitrato em nitrito. As soluções contendo plasma e nitrato-redutase foram incubadas por 3hs em temperatura ambiente. Após este período, 100µl das amostras foram incubadas por 10 min com a mesma quantidade da solução de Griess. Essa solução é feita na mistura com proporção 1:1 de 0,1% N-1-nafeti-etilanadamina, (Sigma-N-5898) em água destilada; e 1% de sulfanilamida, (Sigma-S-9251) em 5% de ácido fosfórico (Sigma – P5811). E após este período as amostras foram submetidas à leitura por espectofotometria em 540nm. As concentrações corrigidas de NO foram obtidas através da correlação com uma curva crescente de concentração de nitrito conhecida. Os valores obtidos foram dados em µM.

8.14 Cultura de trombócitos

Trombócitos foram cultivados objetivando avaliação morfológica destas células, uma vez que em situação fisiológica, são vistas vivas e aderentes nas primeiras horas de cultivo (DaMatta *et al.*, 1999). Com este propósito, 3 mL de sangue heparinizado dos animais de todos os quatro grupos experimentais com diferentes parasitemias foram coletados. As amostras foram diluídas na mesma quantidade de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) e cuidadosamente sobrepostas em 3 mL de Percoll a 60% em DMEM com índice de refração de 1,347. As amostras foram centrifugadas (600 xg por 20 min), a porção contendo leucócitos e trombócitos foi coletada, e adicionada em um novo tubo, e lavadas duas vezes com DMEM por centrifugação (450 xg por 10 min). Posteriormente, o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de DMEM e as células contadas em câmara de Neubauer. A concentração celular foi ajustada com DMEM para 1×10^7 células/mL. Após, 150 μ L de cada amostra foi semeado sobre lamínulas redondas (formando uma bolha) contidas em placas de cultura de 24 poços. Após 1 h de cultivo a 37 °C em 5% de CO₂, as lamínulas foram lavadas com solução de Hank, para eliminar células não aderentes. Parte das amostras foi fixada em formaldeído 4% em PBS e a outra parte foi cultivada por 24hs com DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Após este período de cultivo, as lamínulas foram fixadas da mesma forma. Dois procedimentos distintos foram realizados nas amostras de 1 e 24hs de cultivo após fixação: 1 – Coloração com Giemsa 10%, desidratação em acetona-xilol e montagem da lamínula em lâmina usando Entellan. Neste caso, o propósito foi realizar estudo morfológico dos trombócitos; 2 – Preparo da amostra para imunofluorescência.

8.15 Imunofluorescência de trombócitos

Após a fixação das células cultivadas por 1 e 24 hs, as lamínulas contendo as células foram lavadas com PBS, incubadas em PBS contendo 100 mM de cloreto de amônio, por 30 min e com PBS contendo 3% de albumina de soro bovina (PBS/BSA). Posteriormente, foi feita incubação com o anticorpo primário anti-trombócito de galinha (11C3) feito em camundongo. O anticorpo foi diluído na proporção de 1:10 em PBS/BSA e a incubação realizada por 1h em temperatura ambiente. O anticorpo primário foi produzido em cultura de hibridoma, monoclonal, e cedido gentilmente pelo prof Dr. Kanellopoulos-Langevin C. Após este período,

as células foram lavadas com PBS, incubadas por 10 min na solução PBSBSA, e posteriormente, com o anticorpo secundário anti-camundongo (Sigma), diluído 1:100 em PBSBSA conjugado com TRITC, por 1 h. As células foram lavadas em PBS e montadas em ProlongGold[®] contendo DAPI. As lamínulas foram examinadas em microscópio Axioplan Zeiss equipado com fluorescência. As imagens foram feitas com a câmera MRc5 pelo programa Axiovision, Zeiss.

8.16 Análises estatísticas

Os valores encontrados durante todo o experimento foram apresentados em médias e desvios padrões. Quando necessário, foi realizado ANOVA seguido de um teste estatístico adequado. Os resultados foram dispostos em correlação com parasitemia ou sobrevivência, que são relacionados entre si. Os animais desenvolveram respostas particulares frente à infecção, o que é esperado, já que cada organismo se comporta de forma diferente. Desta forma, há uma heterogeneidade no desenvolvimento da patologia ao longo dos dias, pois a parasitemia tem picos diferentes, mesmo tendo todos os animais recebido a mesma carga parasitária. Por isso, os dados hematológicos, bioquímicos e de mensuração de NO plasmático foram agrupados em função da parasitemia e não em dias pós-infecção. O estudo da sobrevivência foi analisado pelo teste de Mantel-Cox e está disposto em um gráfico Kaplan-Meyer. Os animais tratados e não tratados foram comparados usando o teste de Wilcoxon. Os animais não infectados e infectados foram analisados pela ANOVA seguido do teste de Dunnet. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação dos tamanhos entre trombócitos, linfócitos e monócitos de animais não infectados, e infectados de baixa e alta parasitemia.

9 Resultados

9.1 Sobrevivência

Dentro de um mesmo grupo, a mortalidade e o desenvolvimento dos sinais clínicos foi relacionado com a parasitemia. Ou seja, em ambos os grupos isoladamente, quanto maior a parasitemia, mais letal a infecção. Entretanto, quando confrontados os grupos infectados, esse fato não foi observado. Isso porque os animais não tratados tiveram frequência de óbitos significativamente maior em parasitemias menores (Figura 3). Os óbitos no grupo não tratado tiveram início no 10 dpi, enquanto o primeiro animal do grupo tratado morreu no 12 dpi. Em nove dias, houve mortalidade de 66% no grupo não tratado com AG, enquanto o grupo tratado apresentou mortalidade de 33% em cinco dias. Assim, a droga afetou a sobrevivência dos animais tratados. Como esperado, nenhum animal controle morreu durante todo o experimento.

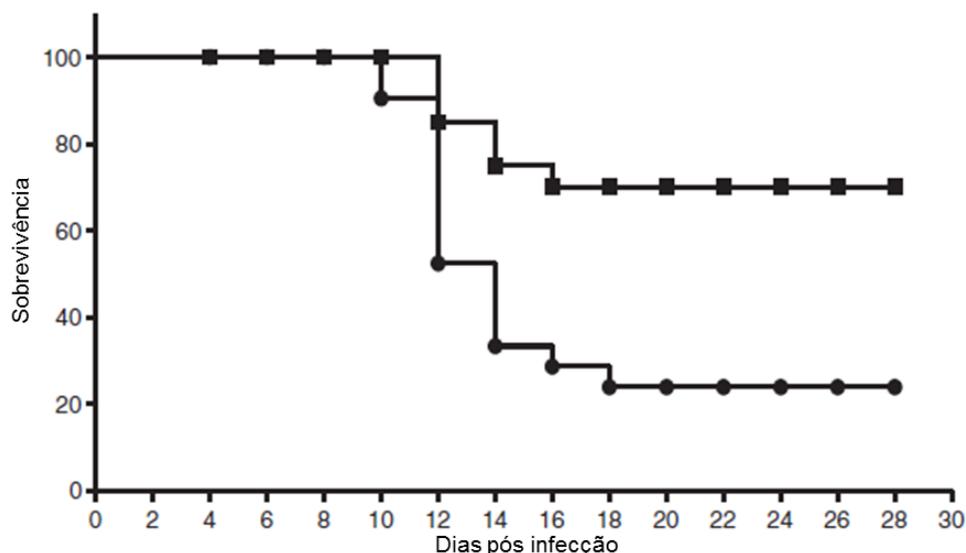


Figura 3: Curvas de mortalidade entre os grupos infectados tratados (■) ou não (●) com aminoguanidina. Notar que nos animais não tratados, os óbitos iniciam-se no 10 dpi e finalizaram no 18 dpi, quando o grupo fica estável e cronifica com 34% de sobreviventes. Nos animais tratados, os óbitos ocorrem entre 12 e 16 dpi, com 33% de mortalidade.

9.2 Parasitemia

Parasitas intraeritrocitários foram observados a partir do 6 dpi nos animais infectados tratados e não tratados com AG, até o 26º dia nos animais não tratados e no 28º dia nos tratados. Ou seja, ao passo que aumentava a parasitemia, mais frequentes e graves eram os sintomas e óbitos nos dois grupos de animais

infectados. Entretanto, a parasitemia foi maior nos animais tratados com AG, e significativamente maior no dia 12 dpi. Na fase crônica, os parasitos eram raramente observados, mas identificados após uma observação mais prolongada. Na figura 4 estão dispostas as parasitemias médias dos grupos tratado e não tratado com AG ao longo de todo o experimento até a cronificação. Como esperado, nenhum animal controle apresentou inclusões maláricas (dados não mostrados).

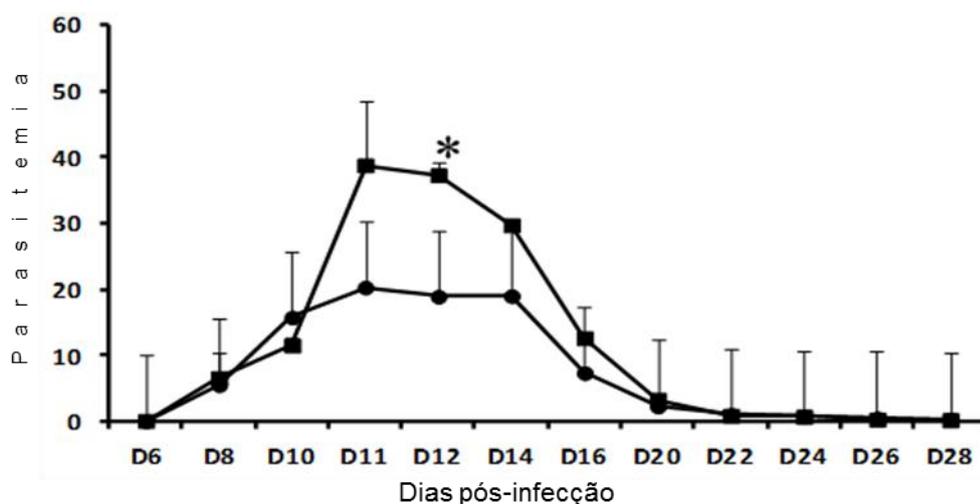


Figura 4: Parasitemias médias dos grupos tratado (■) e não tratado (●) com aminoguanidina. Os animais tratados desenvolveram significativamente maior parasitemia no 12 dpi * significância $p < 0,05$.

A parasitemia em ambos grupos não seguiu aumento linear homogêneo, mas muitas vezes abrupto e correlacionado com sinais clínicos. Parasitemias ao redor de 55% foram fatais nos animais não tratados, enquanto animais tratados ultrapassavam 70% de parasitemia e apresentavam os mesmos sinais clínicos, entretanto consistentemente mais brandos (dados não mostrados). As médias parasitêmicas no dia do óbito foram 15% maiores nos animais tratados.

9.3 Sinais Clínicos

Neste trabalho, alterações clínicas compatíveis com malária aviária foram observadas. Os frangos infectados apresentaram apatia, anorexia, febre e tremores, palidez de mucosa, e alterações neurológicas, além de diarreia, algumas vezes esverdeada. Alguns animais demonstraram tremores musculares na face e nistagmus. Muito frequentemente os animais demonstravam postura irregular.

Neste caso apresentavam-se com as pernas variavelmente dobradas e com o pescoço abaixado. Postura correlacionada com febre, dor ou fraqueza. Os sinais mais comuns foram apatia e palidez de mucosa em ambos os grupos. Com aumento da parasitemia, foram observadas fezes bastante escuras e esverdeadas. Animais que sobreviveram à fase aguda e entraram na fase crônica não apresentavam qualquer sinal clínico.

Os animais tratados e não tratados tiveram os mesmos sinais, exceto a alteração vocal, só encontrada em um animal não tratado. Apesar dos sintomas serem essencialmente os mesmos em ambos os grupos, esses foram observados de forma muito mais intensa nos animais não tratados. Os animais controle permaneceram saudáveis durante o trabalho.

9.4 Hematologia

Foram observadas alterações hematológicas nos grupos parasitados tratados e não tratados com AG. Estes dados estão contextualizados com a patogênese malárica, que incluem alterações hematómicas (Swann, 1973), leucocitárias (Hansen, 2012) e nos trombócitos (Francischetti *et al.*, 2008).

9.5 Eritrograma

9.5.1 Eritrometria

Animais infectados tratados e não tratados tiveram alterações no eritrograma. O número de eritrócitos apresentou queda enquanto a infecção se tornava aguda, o que está correlacionado com a parasitemia. Logo no início da infecção, quando a parasitemia ainda estava abaixo de 10%, ambos grupos infectados apresentaram queda do número de eritrócitos, que os diferenciava dos respectivos controles. E assim permaneceu durante todo o período até a cronificação, como visto na figura 5. Os animais controle não infectados (NI) foram alocados em dois sub-grupos de 4 animais. As coletas nos grupos controle foram feitas a cada dois dias, embora tenha sido feita alternância entre os dois sub grupos. Desta forma, o mesmo animal controle só foi manipulado a cada 4 dias. Na figura abaixo, as colunas relacionadas aos grupos controle (NI) representam as médias observadas de todo o período experimental.

Na fase crônica os animais não tratados apresentaram contagens de eritrócitos inferiores aos controles, enquanto o número de eritrócitos dos animais tratados retornou à normalidade. Quando a parasitemia apresentava-se acima de 31%, houve diferença na contagem entre animais infectados tratados e não tratados, sendo que frangos não tratados apresentaram quantidade de hemácias significativamente menores que os animais tratados com AG. Assim como na fase crônica, quando os animais tratados apresentaram maior número de hemácias que os animais não tratados.

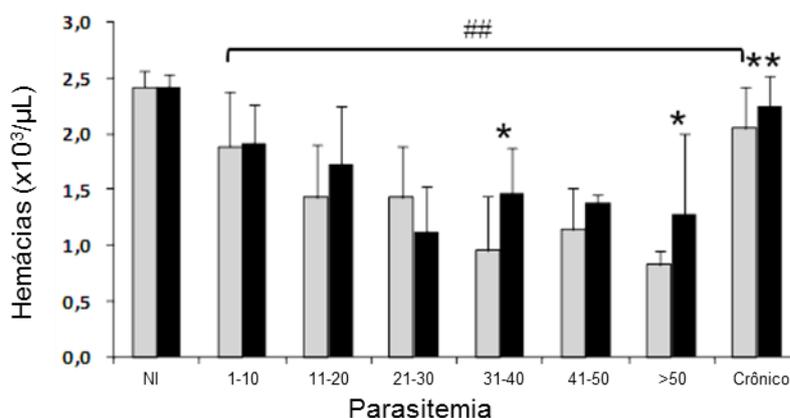


Figura 5: Contagem de eritrócitos por μL de sangue de animais controle (NI), infectados não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina. As contagens médias ao longo do período dos animais controle estão dispostas à esquerda do gráfico (NI). Notar queda do número de eritrócitos nos grupos infectados a partir de parasitemias abaixo de 10%, que se prolonga por toda a fase aguda e até a cronificação nos animais não tratados. Em altas parasitemias e na cronificação, a contagem de hemácias nos animais tratados com AG foi significativamente maior que nos animais não tratados. Animais não infectados, $n=22$ não tratados e 22 tratados. Para parasitemias entre 1-10%, $n=24$ não tratados e 30 tratados. Entre 11-20%, $n=14$ não tratados e 16 tratados; 21-30%, $n=5$ não tratados e 11 tratados; 31-40%, $n=6$ não tratados e 7 tratados; 41-50%, $n=4$ não tratados e 6 tratados; >50%, $n=4$ não tratados e 4 tratados. ## Estatisticamente significante ($p < 0,01$) em relação ao controle não infectado. * Significante ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$ for **) em relação ao respectivo grupo não tratado.

9.5.2 Volume Corpuscular Médio

O tamanho médio das hemácias, VCM, variou consideravelmente durante a maior parte do tempo do experimento. Mas de forma mais intensa nos animais que não receberam AG. Nos momentos iniciais, com parasitemia abaixo de 11%, não houve qualquer variação nos grupos (Figura 6). O grupo não tratado teve VCM aumentado quando a parasitemia apresentava-se acima de 11%, quando comparado ao seu controle. Não foi observado aumento do VCM quando a parasitemia estava entre 21 e 30%. Mas a partir daí, esse grupo novamente demonstrou aumento do VCM durante o curso agudo da doença, somente voltando ao normal na cronificação. Os animais tratados somente se diferenciaram de seu controle em parasitemias acima de 50% e na fase crônica. E mesmo assim, de forma mais sutil, pois apresentaram VCM menor que os animais tratados.

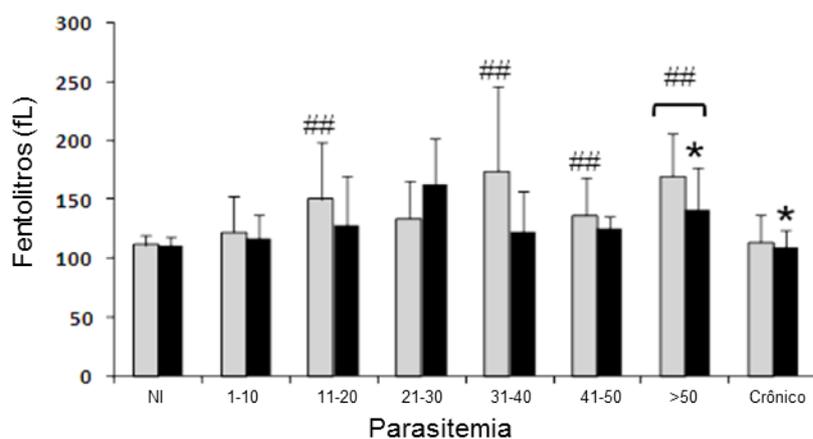


Figura 6: VCM dos frangos controle (NI), infectados não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina. Os animais não tratados tiveram variações significativas em relação ao controle não infectado. Os animais tratados somente diferenciaram de seu controle não infectado em parasitemias acima de 50%. As hemácias dos animais tratados foram consideravelmente maiores que as dos não tratados em parasitemias acima de 50% e na cronificação. Animais não infectados, n=22 não tratados e 22 tratados. Para parasitemias entre 1-10%, n= 24 não tratados e 30 tratados. Entre 11-20%, n= 14 não tratados e 16 tratados; 21-30%, n= 5 não tratados e 11 tratados; 31-40%, n= 6 não tratados e 7 tratados; 41-50%, n= 4 não tratados e 6 tratados; >50%, n = 4 não tratados e 4 tratados. ## significante ($p < 0.01$) em relação ao controle não infectado. * Significante ($p < 0.05$) em relação ao respectivo grupo não tratado.

9.5.3 Volume Globular ou Hematócrito

O VG teve variação significativa ao longo da infecção, com forte correlação com a parasitemia e influenciado diretamente pela hematimetria, citada acima. Os grupos não tratados e tratados com AG tiveram queda nos parâmetros de VG (Figura 7). Logo em baixos níveis de parasitemia, foi observada diminuição do VG nos animais infectados em comparação aos respectivos controles e essa diferença com os grupos não infectados foi mantida na cronificação. Mas neste parâmetro não houve diferença entre grupo tratado e não tratado na fase aguda da doença. Na cronificação, no entanto, esse achado foi pertinente, e o VG dos animais tratados foi maior.

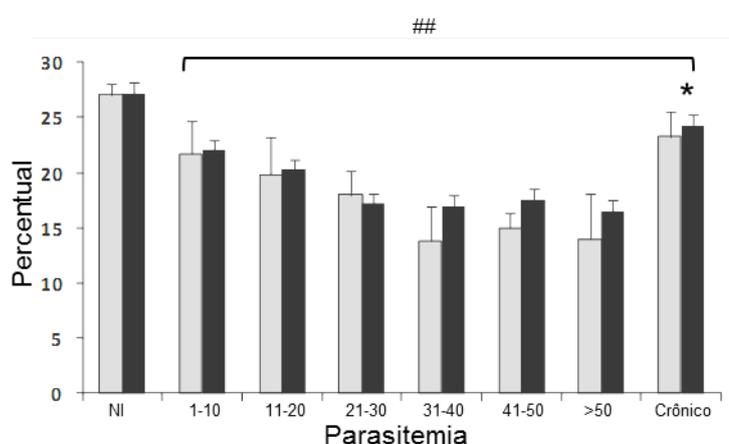


Figura 7: Hematócrito de animais controle (NI), não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina. Durante todo o experimento e na cronificação, o hematócrito dos frangos infectados esteve abaixo dos valores dos controles. Entretanto, na cronificação, os animais tratados tinham valores mais próximos dos fisiológicos. Animais não infectados, n=22 não tratados e 22 tratados. Para parasitemias entre 1-10%, n= 24 não tratados e 30 tratados. Entre 11-20%, n= 14 não tratados e 16 tratados; 21-30%, n= 5 não tratados e 11 tratados; 31-40%, n= 6 não tratados e 7 tratados; 41-50%, n= 4 não tratados e 6 tratados; >50%, n = 4 não tratados e 4 tratados. ## Significante ($p < 0.01$) em relação ao controle não infectado. * Significante ($p < 0.05$) em relação ao respectivo grupo não tratado.

9.5.4 Hemoglobinometria

A concentração de hemoglobina também demonstrou queda ao longo do experimento (Figura 8). Na fase aguda, mas ainda com baixas parasitemias, os animais infectados demonstraram significativa queda quando comparados aos seus controles. A concentração de hemoglobina permaneceu reduzida nos dois grupos de animais infectados após cronificação. Somente com aumento da parasitemia acima de 50% houve diferença entre grupos de animais infectados. Os frangos infectados tratados com AG apresentaram padrões menos agressivos que o grupo não tratado em parasitemias superiores a 50%.

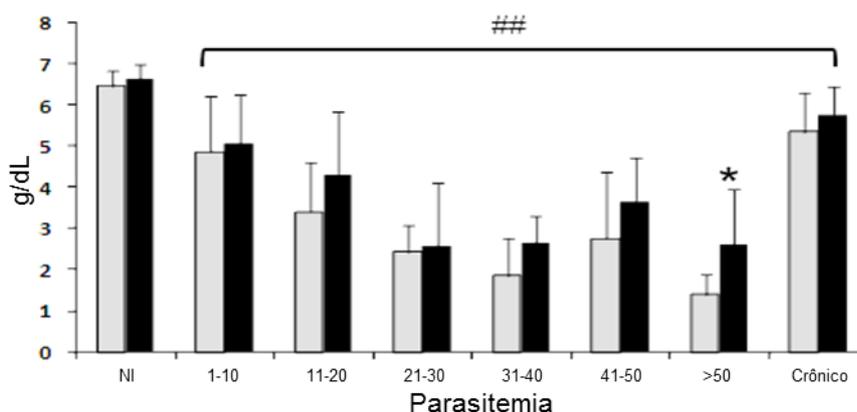


Figura 8: Concentração de Hemoglobina Média – Hemoglobinometria (Hb) de animais controle (NI), não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina. Este parâmetro foi drasticamente alterado durante todo o experimento, pois ambos os grupos tiveram considerável queda em seus valores. Notar que em parasitemias acima de 50%, animais tratados com aminoguanidina tiveram concentrações séricas de hemoglobina superiores aos animais não tratados. Animais não infectados, n=22 não tratados e 22 tratados. Para parasitemias entre 1-10%, n= 24 não tratados e 30 tratados. Entre 11-20%, n= 14 não tratados e 16 tratados; 21-30%, n= 5 não tratados e 11 tratados; 31-40%, n= 6 não tratados e 7 tratados; 41-50%, n= 4 não tratados e 6 tratados; >50%, n = 4 não tratados e 4 tratados. ## Significante ($p < 0.01$) em relação ao controle não infectado. * Significante ($p < 0.05$) em relação ao respectivo grupo não tratado.

9.5.5 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

A CHMC demonstrou-se um pouco mais variável em relação aos padrões hematológicos supracitados. Os valores apresentados pelos frangos infectados não tratados demonstraram queda em relação ao seu controle quando a parasitemia estava acima de 11%, só voltando à normalidade na cronificação (Figura 9). Os animais tratados somente diferenciaram-se do controle acima de 21% de parasitemia, e também só voltaram à normalidade na cronificação. Somente em parasitemias acima de 50% houve diferença entre grupos infectados. Neste estágio, os animais tratados apresentaram CHCM significativamente maior que os animais não tratados.

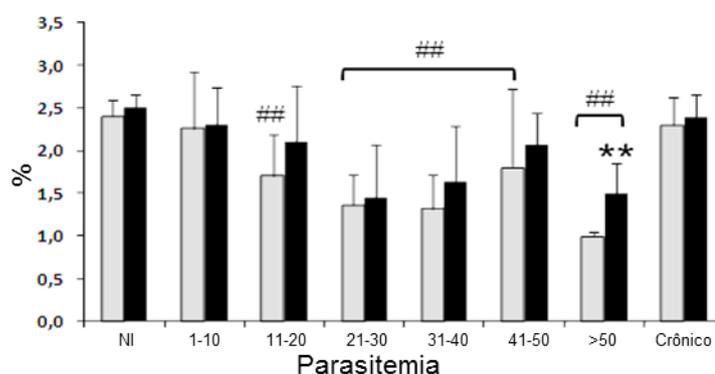


Figura 9: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) de animais controle (NI), não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina. Nos animais não tratados (barra cinza) este índice apresentou alterações a partir de 11% de parasitemia e persiste ao longo da fase aguda, mas não na cronificação. Os animais tratados tiveram alteração mais tardia, e também normalizaram na cronificação. Os valores nos animais tratados com AG foram maiores, particularmente em parasitemias acima de 50%. Animais não infectados, n=22 não tratados e 22 tratados. Para parasitemias entre 1-10%, n= 24 não tratados e 30 tratados. Entre 11-20%, n= 14 não tratados e 16 tratados; 21-30%, n= 5 não tratados e 11 tratados; 31-40%, n= 6 não tratados e 7 tratados; 41-50%, n= 4 não tratados e 6 tratados; >50%, n = 4 não tratados e 4 tratados. ## Estatisticamente significativa ($p < 0.01$) em relação ao controle não infectado. **Significante ($p < 0.01$) em relação ao respectivo grupo não tratado.

9.5.6 Alterações morfológicas dos eritrócitos

Com o aumento da parasitemia e conseqüente hemólise de hemácias, foram observados eritrócitos jovens, fato que se tornou cada vez mais frequente ao longo do período de infecção. Durante altas parasitemias acima de 35%, 19,2% dos eritrócitos apresentaram sinais de imaturidade. Quanto maior a parasitemia, maior a quantidade de eritrócitos jovens nos grupos infectados (Figura 10). Eritrócitos foram observados em vários estágios de maturação, e destes, 13% estavam parasitados. Eritrócitos jovens no transcorrer da infecção são mostrados na figura 11. Esses acontecimentos não se diferenciaram entre grupos, pois ambos tiveram graves quadros hemolíticos.

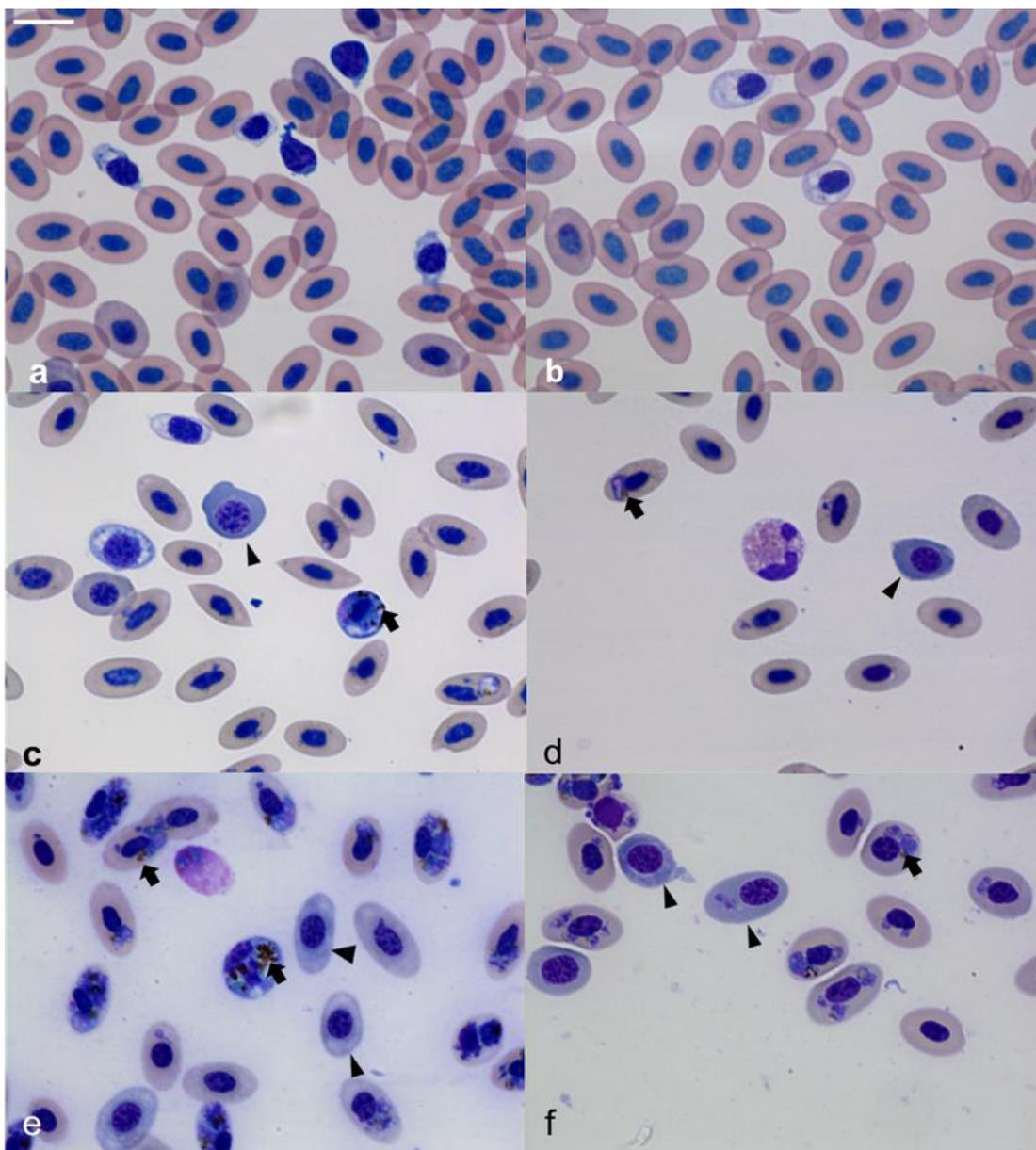


Figura 10: Esfregaços sanguíneos de frangos controle (a-b) e infectados por *Plasmodium gallinaceum* (c-f). Animais controle não tratados (a) e tratados com AG (b) apresentam eritrócitos de morfologia normal. Em “c”, animal infectado não tratado com AG, com parasitemia inferior a 10%, enquanto em “d”, seu correlato, tratado com AG. Em baixas parasitemias já há hemólises, e hemácias jovens (cabeças de seta) já são vistas com maior frequência. Em altas parasitemias, animais não tratados (e) e tratados (f) com AG apresentam maior proporção de células jovens. Em “c-f”, nota-se acúmulo de pigmento malárico (setas), hemozoína, típico de infecções por *Plasmodium*. Barra:10 μ m.

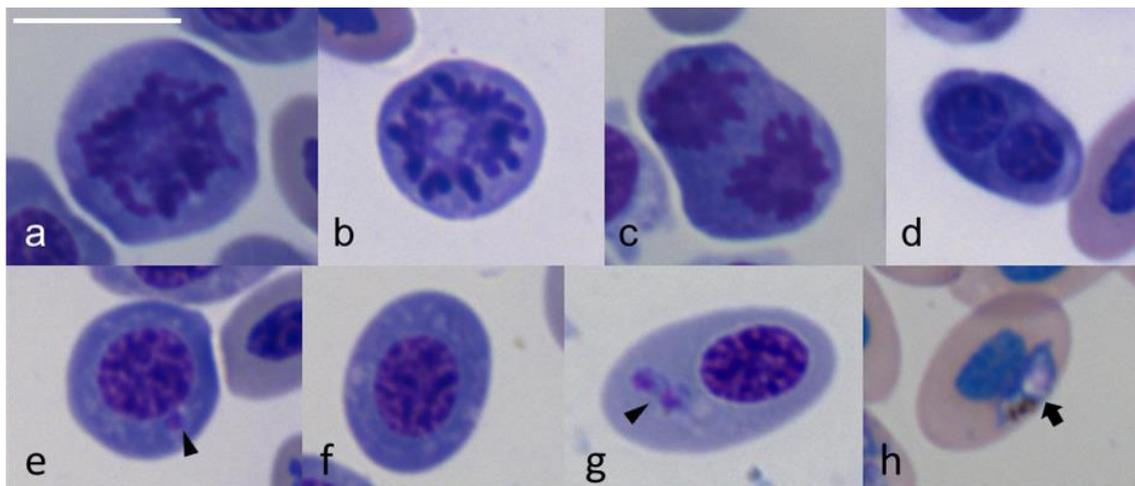


Figura 11: Detalhamento morfológico das hemácias infectadas. Hemácias de animais infectados foram observadas em vários estágios de maturação, tanto em animais não tratados como tratados com AG. Eritrócitos em prófase (a), prometáfase (b), anáfase (c) e telófase (d) foram observados, assim como hemácias jovens infectadas em diferentes momentos do ciclo celular (e-g). Não somente hemácias maduras (h) foram vistas parasitadas (setas), já que *Plasmodium gallinaceum* foi observado em formas eritróide mais jovens (e, g, cabeça de seta).

10 Leucograma

10.1 Leucometria Global

O número total de leucócitos apresentou tendência de queda ao longo da fase aguda da doença (dados não mostrados). Entretanto, na cronificação, animais não tratados apresentaram tendência ao aumento das contagens.

10.2 Leucometria Específica

10.2.1 Eosinófilos

A contagem de eosinófilos não apresentou diferenças entre grupos infectados e controles no início da infecção. Entretanto, com o transcorrer da doença, foi observada queda no número de eosinófilos, a ponto de não serem vistos durante a contagem dos leucócitos na fase aguda. Essa linhagem celular novamente foi observada na cronificação.

10.2.2 Linfócitos

O Número de linfócitos não se alterou até parasitemias intermediárias. Entretanto, após 41% de parasitemia, ambos os grupos infectados tiveram grande linfocitopenia, diferenciando-se de seus respectivos controles, mas iguais entre si. Na cronificação, foi observada tendência de aumento da contagem (Figura 12).

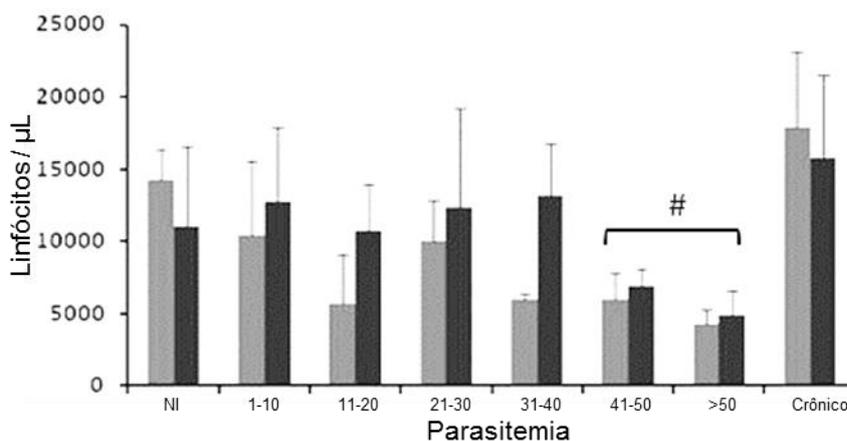


Figura 12: Contagem do número de linfócitos dos animais controle (NI), não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina. Notar linfocitopenia em ambos os grupos infectados com níveis de parasitemia superiores a 41%, quando comparado com os controles. Na fase crônica o número de linfócitos se restabeleceu, com tendência a linfocitose. Animais não infectados, n = 11 não tratados e 12 tratados. Para parasitemias entre 1-10%, n = 17 não tratados e 19 tratados; 11-20% n = 8 não tratados e 16 tratados; 21-30%, 3 não tratados e 6 tratados; 31-40%, 5 não tratados e 5 tratados; 41-50%, 4 não tratados e 4 tratados; > 50% n = 3 não tratados e 4 tratados; animais crônicos, n = 22 não tratados e 16 tratados. # Significância estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle não infectado.

10.2.3 Monócitos

As contagens de monócitos foram diminuídas nos dois grupos de animais infectados já em baixas parasitemias, como mostrado na figura 13. Entretanto, com o aumento da parasitemia entre 30 e 50%, animais não tratados tiveram tendência a monocitose, enquanto animais tratados com AG tiveram diminuição das contagens. Em parasitemias acima de 50%, animais não tratados tiveram tendência ao aumento.

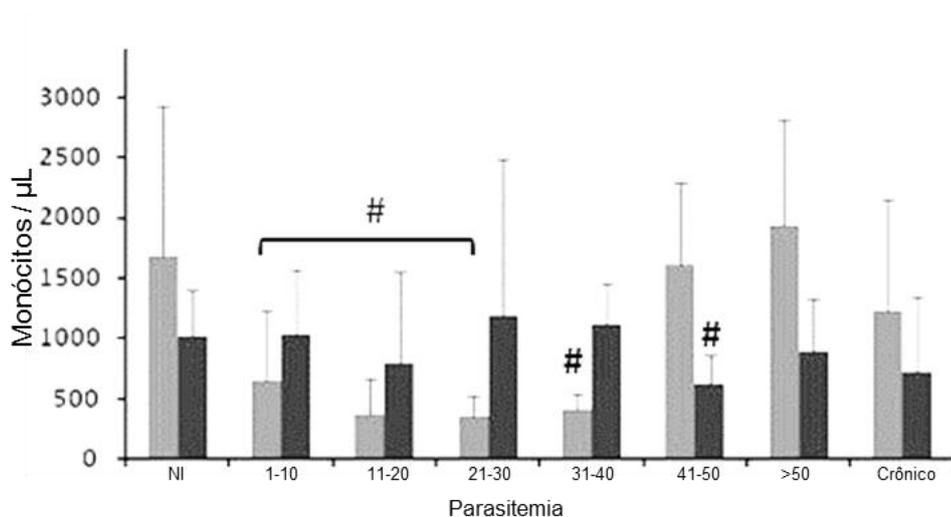


Figura 13: Contagens de monócitos durante o período experimental dos animais controle (NI), não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina. Animais não tratados mostraram monocitopenia até parasitemias de 30%. A partir de 41%, o aumento da parasitemia foi seguido por uma correlata tendência a monocitose até a fase crônica, quando as contagens retornaram ao padrão inicial. Animais tratados tiveram monocitopenia na faixa de parasitemia compreendida entre 41 e 51%. Animais não infectados, n = 11 não tratados e 12 tratados. Para parasitemias entre 1-10%, n = 17 não tratados e 19 tratados; 11-20% n = 8 não tratados e 16 tratados; 21-30%, 3 não tratados e 6 tratados; 31-40%, 5 não tratados e 5 tratados; 41-50%, 4 não tratados e 4 tratados; > 50% n = 3 não tratados e 4 tratados; animais crônicos, n = 22 não tratados e 16 tratados. # Significância estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle não infectado.

10.2.4 Heterófilos

A contagem heterofílica permaneceu relativamente estável até parasitemias de 30%, como mostrada na figura 14. A partir daí, observou-se queda em ambos os grupos, só voltando à normalidade na fase crônica. Poucos bastonetes foram observados na fase aguda da doença. Desta forma, heterófilos em bastão foram agrupados juntamente com heterófilos maduros.

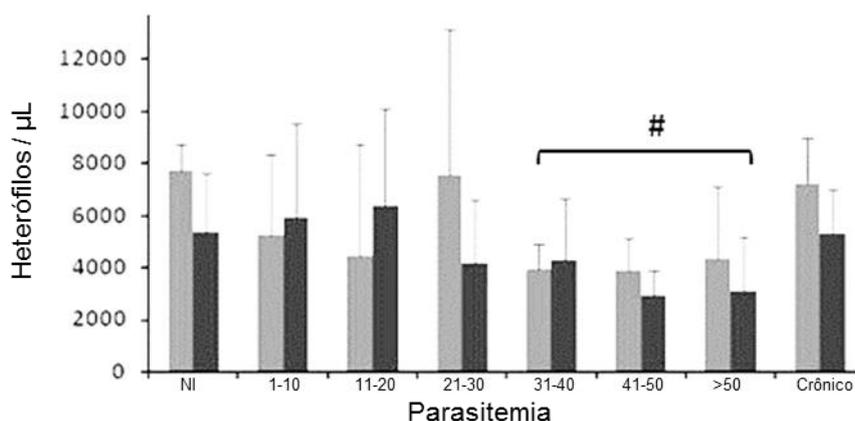


Figura 14: Contagens de heterófilos durante o período experimental dos animais controle (NI), não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina. Notar heterofilopenia nos dois grupos infectados em parasitemias superiores a 30%, mas contagens dentro do padrão após a cronificação. Animais não infectados, n = 11 não tratados e 12 tratados. Para parasitemias entre 1-10%, n = 17 não tratados e 19 tratados; 11-20% n = 8 não tratados e 16 tratados; 21-30%, 3 não tratados e 6 tratados; 31-40%, 5 não tratados e 5 tratados; 41-50%, 4 não tratados e 4 tratados; > 50% n = 3 não tratados e 4 tratados; animais crônicos, n = 22 não tratados e 16 tratados. # Significância estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle não infectado.

10.2.5 Morfologia e morfometria dos leucócitos

Em parasitemias acima de 40%, 1% dos monócitos e 5% dos heterófilos apresentaram parasitismo ou acúmulo de hemozeína. O aumento da parasitemia gerou alterações significativas na forma e tamanho de linfócitos e monócitos, mas não de heterofilos. O tratamento com a droga não alterou estes parâmetros, pois essas características não se diferenciaram entre os dois grupos infectados, somente em relação aos controles. A comparação entre tamanho dos linfócitos e monócitos em grupos de parasitemia média e alta em relação ao controle não infectado está disposta na tabela 1.

Tabela 1: Tamanho de linfócitos e monócitos dos animais controle e infectados ao longo da infecção. Note o aumento do tamanho celular em decorrência do processo infeccioso.

Parâmetros	Linfócito	Monócito
Controles	57,4±18,6 ^a	114,9±21 ^a
Média parasitemia	72,1±20,4 ^b	123,1±24,1 ^b
Alta parasitemia	72,2±19,2 ^b	119,9±19,8 ^b

Letras iguais na mesma coluna sinalizam médias iguais; letras diferentes indicam variação pelo ANOVA.

Eosinófilos não tiveram mudanças morfológicas na infecção. Neutrófilos, monócitos e linfócitos tiveram alterações morfológicas consideráveis. Linfócitos de animais controle apresentaram-se arredondados, com baixa área citoplasmática e normalmente menores que monócitos. Com o aumento da parasitemia, linfócitos se tornaram ativos, maiores, com menor área citoplasmática em relação ao núcleo e coloração citoplasmática mais irregular (Figura 15).

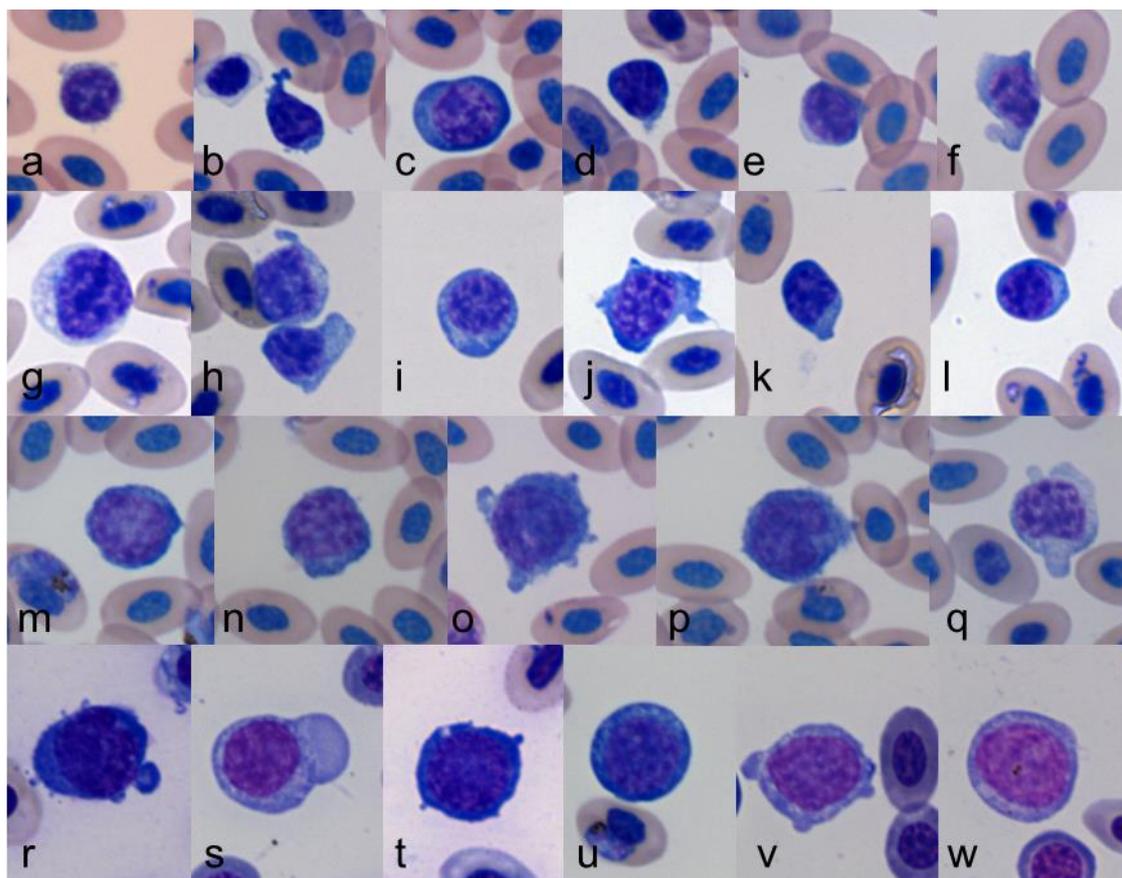


Figura 15: Morfologia de linfócitos. Animais sadios (a-f) apresentam linfócitos de tamanho médio, com núcleo grande em relação à área citoplasmática, com poucos processos de ativação. Animais com baixa parasitemia (g-l) demonstram pouca alteração morfológica, embora já presente, como observado em “l”, em que a célula apresenta-se ativada, com citoplasma bastante basofílico. Em médias parasitemias (m-q) o tamanho das células já é consideravelmente maior que os controles. Em altas parasitemias (r-w), aumenta-se a ocorrência de ativação celular, como visto em “r”, “s”, “t” e “u”. Barra = 10 μ m.

De forma esperada, monócitos de animais controle foram vistos com núcleo irregular, com poucos vacúolos e citoplasma claro. Em parasitemias médias e altas, estas células foram vistas ativadas com mais frequência, com áreas citoplasmáticas com maior impregnação de corante, mais vacuolados e contorno citoplasmático mais irregular (Figura 16).

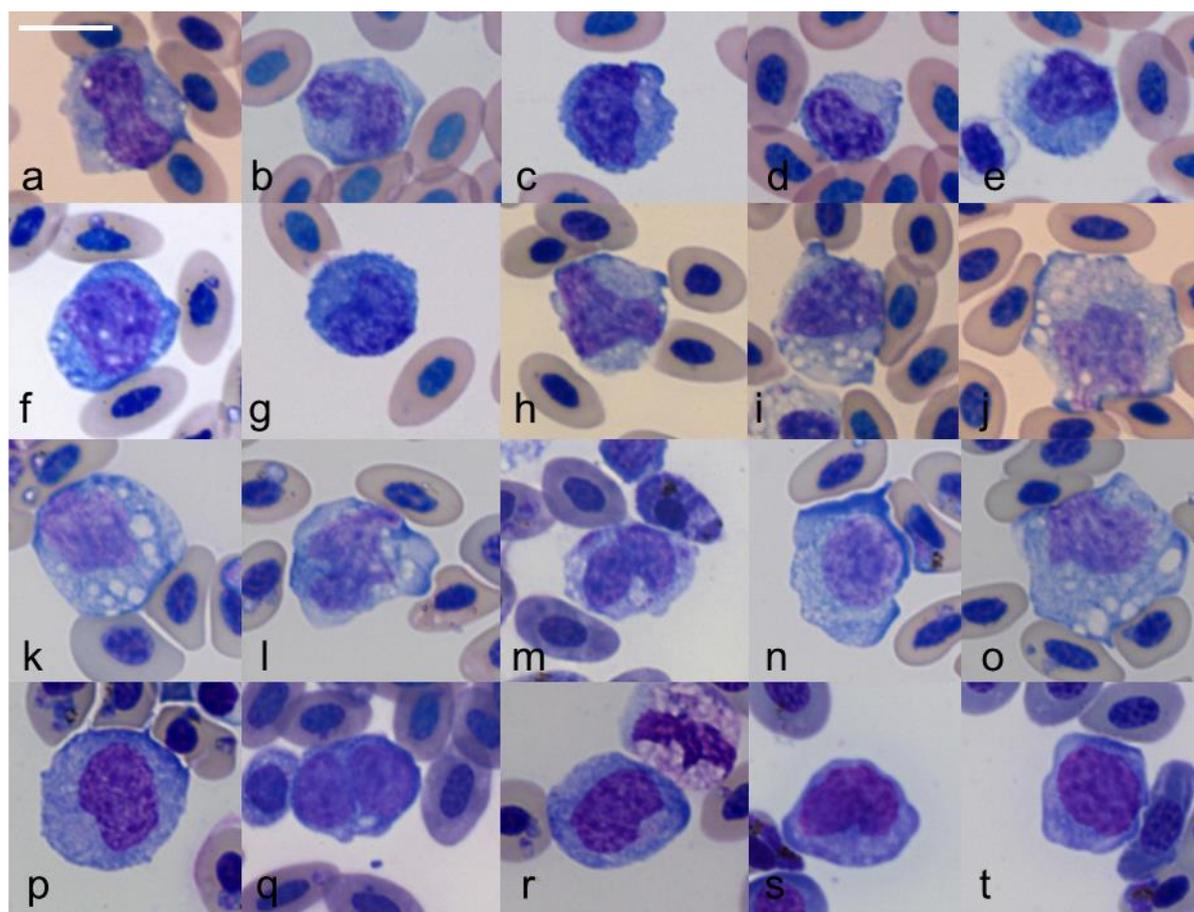


Figura 16: Morfologia de monócitos. Em animais controle (a-e), essas células são vistas não ativadas, com núcleo irregular e citoplasma com poucos vacúolos. Em baixas parasitemias (f-j), já pode ser observada ativação celular, quando são vistas células com citoplasma altamente vacuolado (j). Em médias parasitemias (k-o) aumenta-se os processos de ativação. Em altas parasitemias estes achados seguem sendo vistos, embora haja exceções (p-t). Barra = 10 μ m.

Heterófilos dos animais controle apresentavam-se normalmente com núcleo e tamanho típicos, citoplasma fracamente impregnado com corantes, mas ligeiramente basofílico, apresentando nenhum ou poucos processos tóxicos. Animais em baixa e média infecção não tiveram diferenças morfológicas tão drásticas com o controle, mas já apresentaram toxicidade. Em altas infecções, em ambos grupos e de forma similar, estas células aumentaram consideravelmente sua toxicidade, como visto na figura 17.

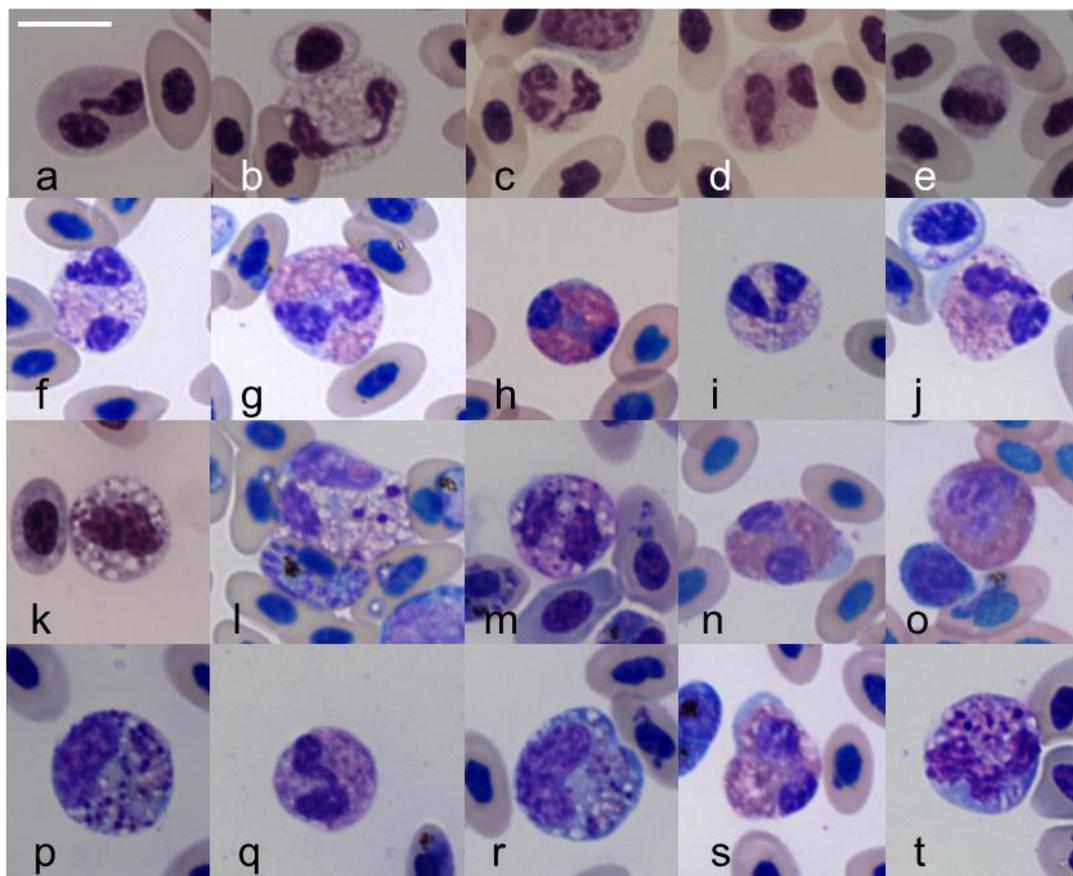


Figura 17: Morfologia heterofílica. Em “a-e” estão dispostos heterófilos de animais controle, com núcleo normalmente lobulado e com citoplasma ligeiramente roseado, atóxico. Em baixas parasitemias (f-j) pode-se notar o aparecimento de processos tóxicos, evidenciado pelo aumento da granulosidade citoplasmática. Esse fenômeno é aumentado em médias parasitemias (k-o) e em altas parasitemias (p-t), quando o processo tóxico se mostra mais exacerbado.

11 Trombócitos

Neste estudo, foi observada importante trombocitopenia nos animais não tratados apresentando parasitemia superior a 11%, enquanto os animais tratados tiveram apenas tendência à trombocitopenia. Em parasitemias acima de 50%, animais não tratados apresentaram contagens trombocíticas significativamente menores que animais tratados (Figura 18). Na cronificação, os valores de ambos grupos apresentaram-se normais.

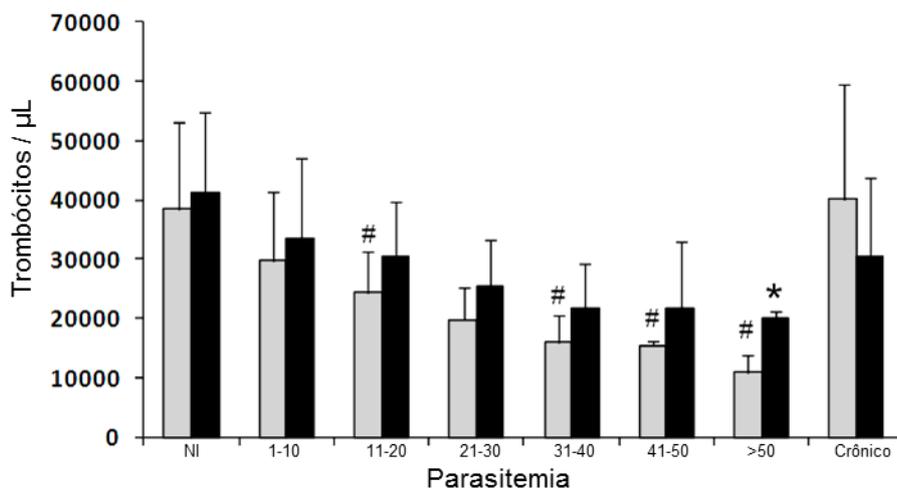


Figura 18: Contagem de trombócitos de animais controle (NI), infectados não tratados (barra cinza) e tratados com aminoguanidina (barra negra). Notar marcante trombocitopenia nos animais não tratados a partir de parasitemias de 11%, quando comparado com seu controle. Na cronificação, as contagens foram reestabelecidas. Animais não infectados, n = 11 não tratados e 12 tratados. Para parasitemias entre 1-10%, n = 17 não tratados e 19 tratados; 11-20% n = 8 não tratados e 16 tratados; 21-30%, 3 não tratados e 6 tratados; 31-40%, 5 não tratados e 5 tratados; 41-50%, 4 não tratados e 4 tratados; > 50% n = 3 não tratados e 4 tratados; animais crônicos, n = 22 não tratados e 16 tratados. # Significância estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle não infectado; * Significância estatística ($p < 0.05$) em relação ao respectivo grupo não tratado.

Alterações morfológicas nos trombócitos foram observadas. Trombócitos de animais infectados apresentaram tendência a se tornar ativados, sendo maiores e com vacúolos aumentados de tamanho. Com o aumento da parasitemia, trombócitos jovens foram observados, de formato significativamente maior, arredondados, algumas vezes em plena mitose, como mostrado na figura 19. Trombócitos de animais não infectados tem em média $30.9 \mu\text{m}^2$, enquanto animais em baixa parasitemia em área de $52.8 \mu\text{m}^2$ e em alta, $70.6 \mu\text{m}^2$. Trombócitos foram vistos sendo parasitados nos dois grupos de animais infectados, mas esta situação foi mais frequente com o aumento da parasitemia. Quando a parasitemia alcançava 40%, em média 4,2% dos trombócitos foram vistos parasitados. Trombócitos infectados por *P. gallinaceum* são mostrados na figura 20.

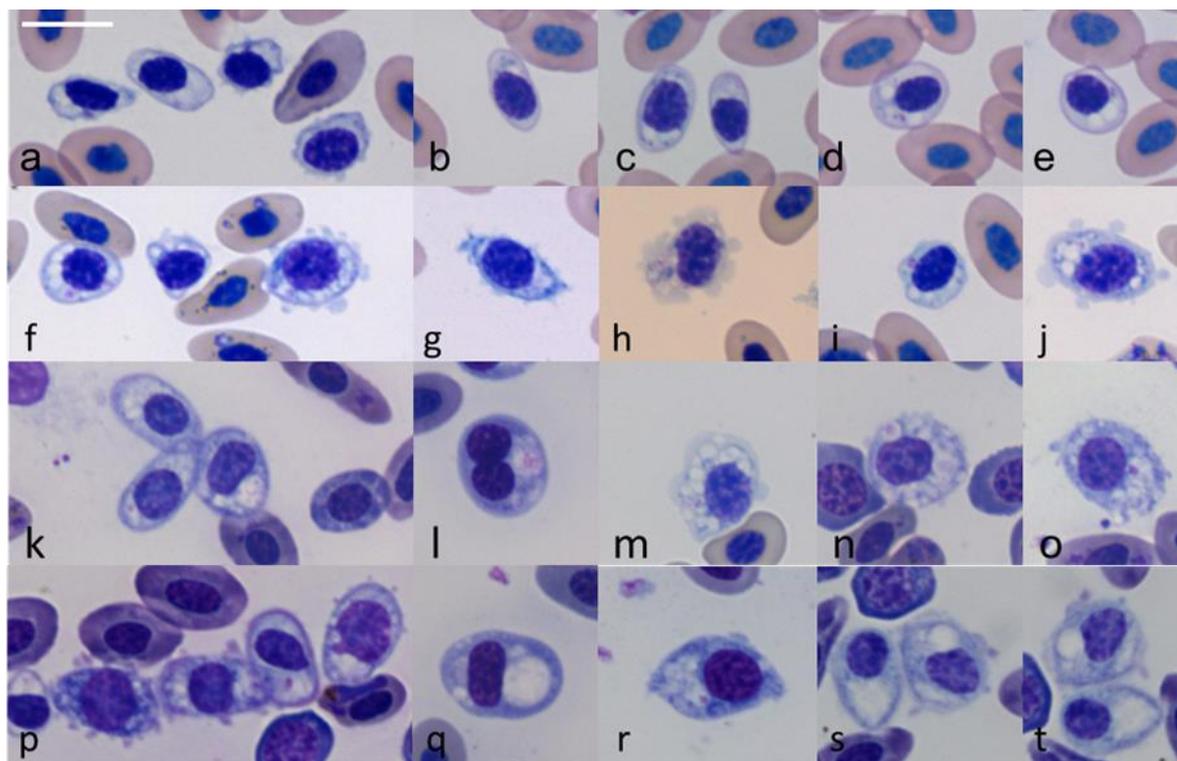


Figura 19: Demonstração de trombócitos de animais controle (a-e) e infectados por *Plasmodium gallinaceum* (f-t). Nos animais controle, estas células estão em seu formato característico, com núcleo ovalado a arredondado e citoplasma claro, com vacúolos e grânulos típicos. Em baixa parasitemia (f-j) já se observa sinais de ativação (h), quando o núcleo frequentemente se mostra alterado e o citoplasma comumente maior. Em parasitemias médias (k-o) já se nota trombócitos em divisão (l) e um aumento da frequência de trombócitos ativados (m-o). Em altas parasitemias (p-t) observa-se ainda trombócitos com vacúolos consideravelmente maiores (s-t). Notar que com o transcorrer da parasitemia, os trombócitos se mostram maiores. Barra = 10 μ m.

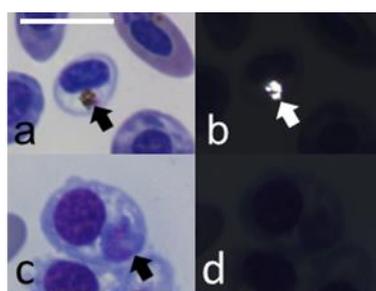


Figura 20: Infecção por *Plasmodium gallinaceum* em trombócitos. Em “a”, é mostrado o parasito circundado por grande quantidade de hemozeína, comprovada pela microscopia de polarização em “b”. Em raras ocasiões, pode se observar o parasito em trombócitos sem aglomerado de hemozeína (c), o que impossibilita a comprovação da mesma pela microscopia de polarização, como visto em “d”. Barra = 10 μ m.

11.1 Cultivo de Trombócitos

Em cultura, alterações morfológicas de trombócitos são mais facilmente observadas, devido o seu maior espalhamento. Após aderência, observou-se trombócitos com grandes vacúolos, e muitas vezes binucleados. Uma minoria de 4% apresentou sinais de apoptose, como retração citoplasmática e condensação nuclear, como mostrado na figura 21.

Para confirmação destas células como realmente trombócitos, dada a infecção e alteração morfológica nas células, foi usado um anticorpo monoclonal para realização de imunofluorescência, que validou a hipótese (dados não mostrados).

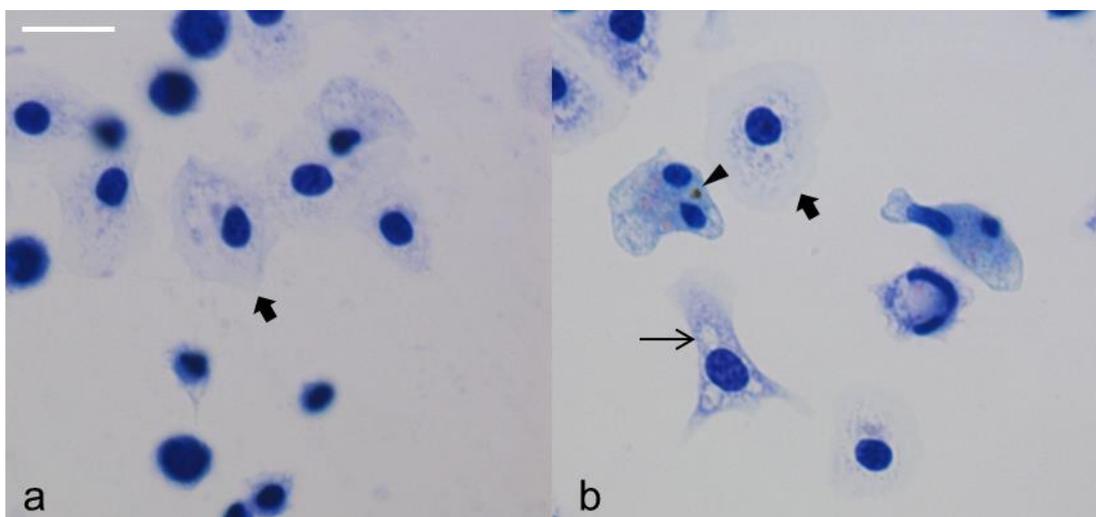


Figura 21: Trombócitos de galinhas após 1 hora em cultura. Em “a” é mostrado cultivo de trombócitos controle, onde se pode notar (setas) abundância de trombócitos com espalhamento citoplasmático normal e núcleo único. Em “b”, também são verificados trombócitos com morfologia inalterada (seta maior). Entretanto, é evidente a confirmação do observado em esfregaço, de trombócitos binucleados (cabeça de seta), inclusive sendo parasitado. Notar que nos animais parasitados pode haver grandes vacúolos citoplasmáticos (seta menor), coerente com a observação em esfregaço. Barra 10 = μm .

12 Bioquímica Sérica

Testes de função renal, ureia, creatinina e ácido úrico, além do colesterol, tiveram tendência de aumento em ambos grupos infectados, concomitante com o aumento da parasitemia, mas sem significância estatística. Creatinina não teve qualquer alteração (dados não mostrados).

Alanina amino transferase (ALT) apresentou queda em ambos grupos em situações de baixa parasitemia, depois se manteve estável. Na cronificação,

animais não tratados tiveram maiores níveis de ALT que os animais tratados. Houve aumento das concentrações séricas de aspartato amino transferase AST em animais não tratados com parasitemia elevada, acima de 41%. Animais crônicos tiveram tendência de aumento, parecendo haver certa correlação com o ALT. Lactato desidrogenase (LDH), colesterol, ureia e ácido úrico tenderam a aumentar, acompanhando a subida da parasitemia, enquanto creatinina não teve qualquer alteração aparente nem entre infectados e controle nem entre tratados e não tratados com aminoguanidina.

13 Quantificação de óxido nítrico plasmático

A análise das concentrações plasmáticas de óxido nítrico teve dois objetivos. Primeiro, confirmar a ação da AG nos animais tratados, já que nestes, em tese, deveria haver menor concentração. Segundo e mais importante, correlacionar os níveis de NO com as alterações clínicas, patológicas e de sobrevivência. Frangos não tratados apresentando baixa parasitemia tiveram níveis de NO maior que o controle e assim permaneceram por todo o curso agudo da doença (Figura 22). Com aumento da parasitemia, estes índices também foram significativamente maiores quando comparados com animais tratados com AG. O grupo tratado em momento algum se diferenciou de seu controle, validando a ação da droga. Na fase crônica, ambos os grupos apresentaram concentrações plasmáticas idênticas ao controle.

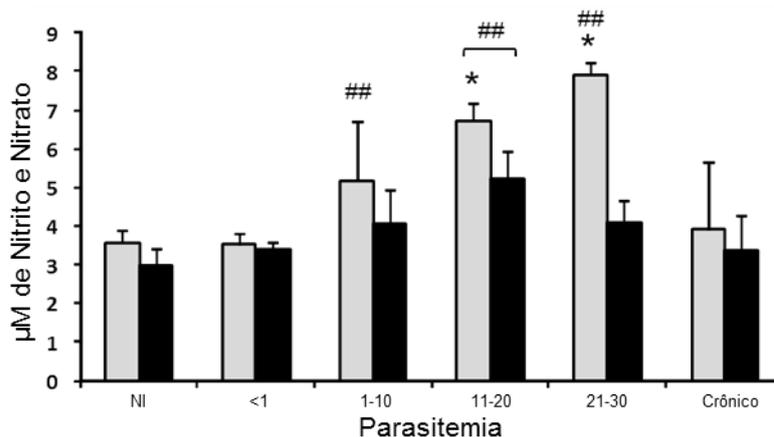


Figura 22: Mensuração plasmática de NO plasmático em animais controle (NI), infectados não tratados (barra cinza) e tratados (barra negra) com aminoguanidina. Notar considerável aumento de NO nos animais não tratados, fato que permanece ao longo de toda a fase aguda e aumenta acompanhando a parasitemia. Em altas parasitemias, os índices de NO nos animais não tratados são superiores aos animais tratados com AG, estes, por sua vez, não apresentaram alterações em nenhum momento. Na fase crônica, ambos os grupos apresentam níveis iguais aos controles. Animais não infectados, n = 11 não tratados e 13 tratados. Para parasitemias <1%, n = 6 para não tratados e 4 para tratados; 11-20%, n = 4 não tratados e 4 tratados; 21-30%, n = 4 não tratados e 4 tratados. Animais crônicos, n = 18 não tratados e 10 tratados. ## Significância ($p < 0.01$) em relação ao valor não infectado. *Significante ($p < 0.05$) em relação ao respectivo valor tratado.

14 Necrópsia e Histopatologia

Os animais eutanasiados na fase aguda da infecção mostraram alterações patológicas, algumas de caráter inflamatório. Durante a necropsia, foram observadas algumas alterações, como edema pulmonar, tamponamento cardíaco, com grande quantidade de líquido pericárdico. Observou-se cardiomegalia, com aspecto edemaciado ao corte. O fígado estava nitidamente megálico e bastante escuro. Observou-se ainda esplenomegalia e rim edemaciado.

14.1 Cérebro

Cérebro e baço foram implicados, mas não o fígado, como importantes destinos de formas exoeritrocíticas de *P. gallinaceum* após infecção por hemácias infectadas (Huff, 1957). Nos animais infectados, foram observadas poucas hemácias suspensas nos capilares (sugere anemia), que por sua vez estavam congestionados, com número de leucócitos aumentado. Observou-se discreto edema meningeano; ampliação do espaço de *Virchow-Robin* (sugere edema); edema na meninge entre a pia-máter e a dura-máter, com deslocamento da aracnoide; hemoconcentrações em capilares isolados e periféricos; estase vascular no pedúnculo cerebelar com aumento de leucócitos; ectasia vascular de vasos meningeanos com hemoconcentração; e quantidade significativa de hemozeína nos capilares e no tecido encefálico. Não houve variação entre os grupos tratados e não tratados. Na fase crônica, os achados histopatológicos não foram mais observados, mas ainda foi possível identificar pigmentos parasitários no leito vascular (dados não mostrados). Na figura 23 estão dispostas micrografias de tecido encefálico.

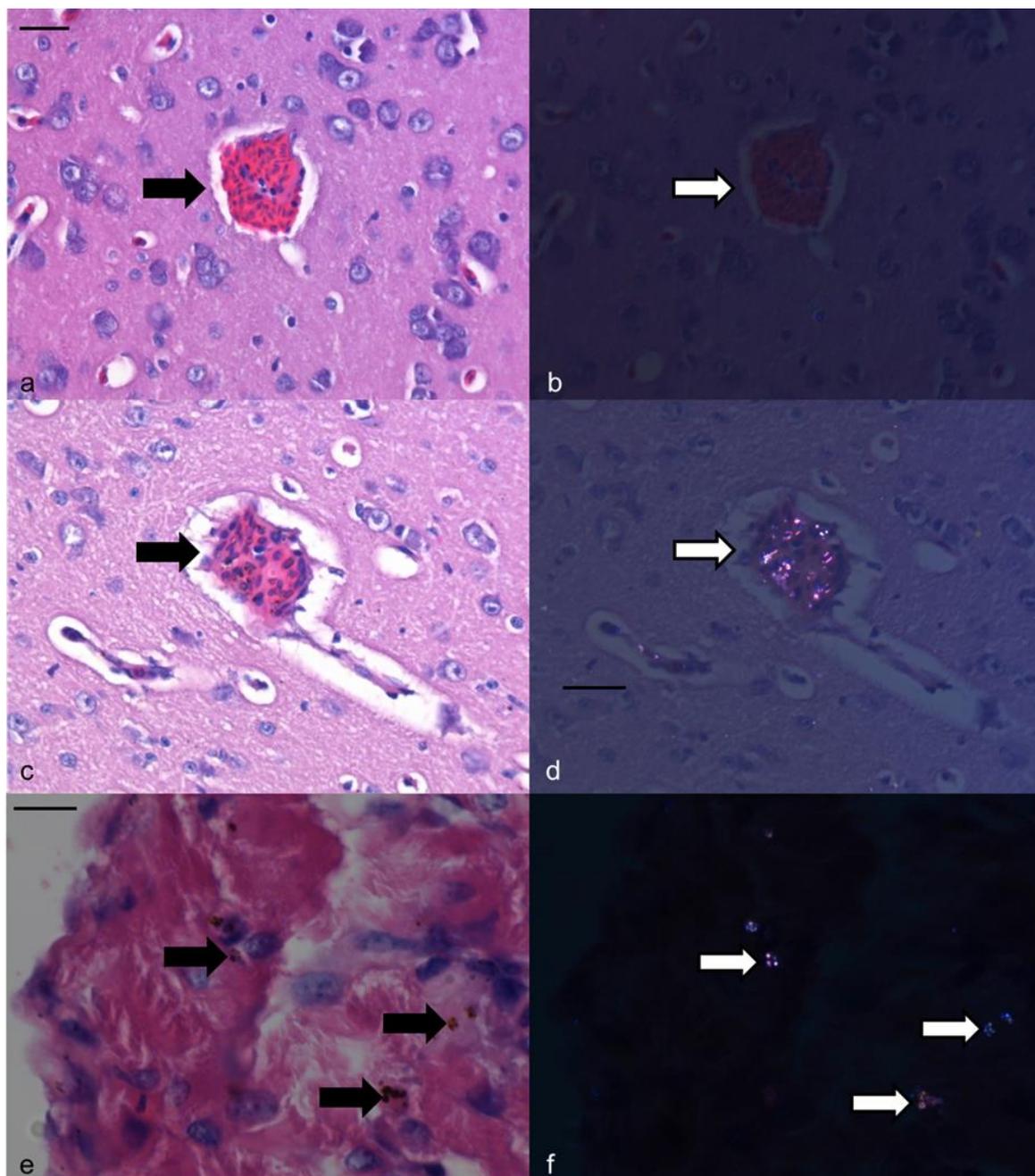


Figura 23: Histologia de encéfalos de animais controle (a,b) e infectados com *Plasmodium gallinaceum* (c-f). No animal controle, notar o leito vascular contendo somente hemácias não parasitadas (a), sendo negativo para hemozeína na microscopia de polarização (b). Na fase aguda da infecção, observa-se muitos leitões vasculares contendo hemácias parasitadas (setas), aumento do influxo de leucócitos e acúmulo de hemozeína (c). A microscopia de polarização evidencia a densidade de hemozeína (d). Em maior aumento (e) pode-se observar que há parasitos fora do leito vascular (setas), no tecido encefálico, confirmado na polarização (f). A-D Barra = 10 μ m, E-F Barra = 10 μ m.

14.2 Fígado

Na histopatologia do fígado, ambos os grupos apresentaram hepatite, com infiltrado inflamatório misto predominantemente mononuclear. No infiltrado, comumente se observava núcleos picnóticos. Nos animais tratados, o infiltrado se mostrou frequentemente menos agressivo que nos animais não tratados e com menor depósito de hemozoína (Figura 24). Necrose de coagulação foi observada frequentemente. Abundância de pigmento malárico, tanto no leito vascular quanto no interior de macrófagos.

Na fase crônica, observou-se frequentemente tumefação difusa e degeneração hidrópica. Nos dois grupos, ainda foi possível observar pigmentos de hemozoína. Animais não tratados, mas não todos, apresentaram hepatite mista com predominância de heterofilos.

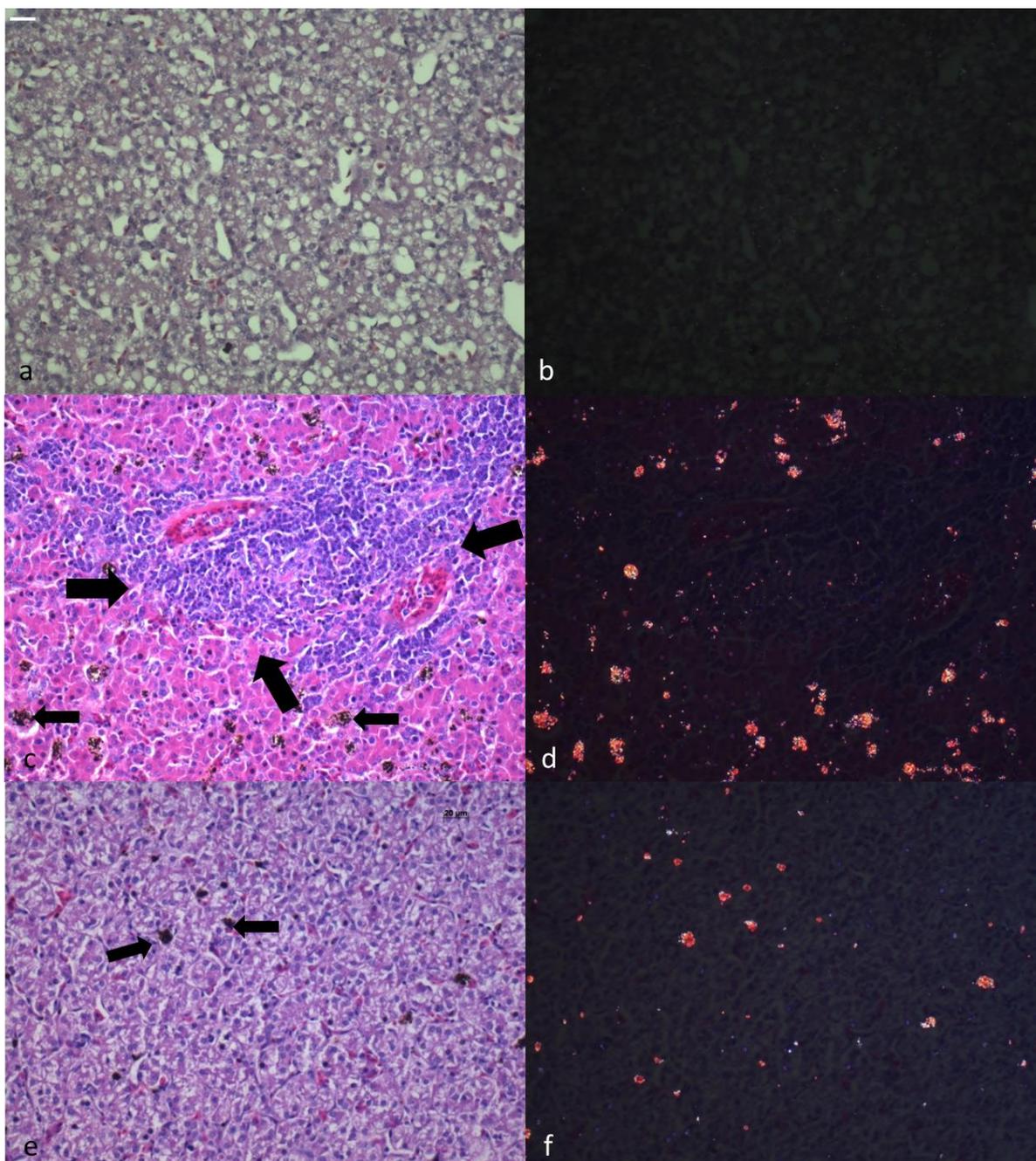


Figura 24: Histopatologia do fígado de animais controle (a,b) e infectados com *Plasmodium gallinaceum* (c-f). Galinhas não infectadas apresentam arquitetura tecidual típica (a) sem acúmulo de hemozoína na microscopia de polarização (b). Em “c”, tecido hepático de galinha infectada não tratada. Notar o grande infiltrado inflamatório (setas grandes) circundando o leito vascular. Há acúmulo grosseiro de hemozoína (setas pequenas), que pode ser comprovada em “d”. Em “e”, fígado de galinha tratada com AG, onde se observa pequenos infiltrados inflamatórios (setas grandes) e ausência de acúmulos grosseiros de hemozoína, embora presentes e confirmadas na polarização (f). Barra 50μm.

14.3 Baço

No baço de animais não tratados, foi observado esplenite heterofílica discreta e depleção linfocitária moderada (Figura 25). Nos animais tratados, depleção linfocitária acentuada, corpos apoptóticos focais e alguns linfócitos mitóticos. Na fase aguda, animais não tratados tiveram maior deposição de pigmento de hemozoína no baço. Na fase crônica, este órgão retornou à morfologia normal, com áreas de polpas brancas e vermelhas bem definidas.

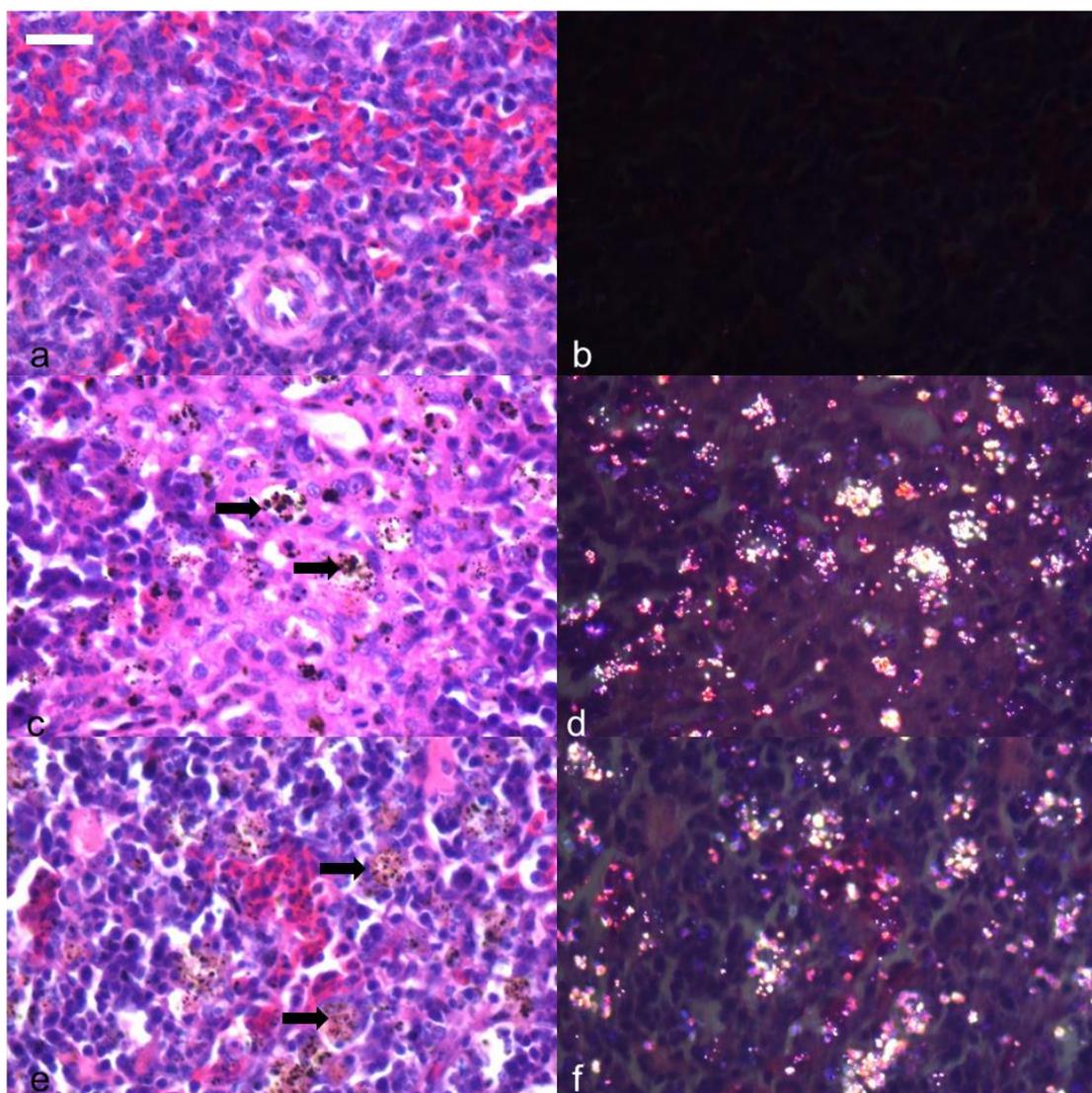


Figura 25: Histopatologia do baço de animais controle (a,b) e infectados com *Plasmodium gallinaceum* (c-f). Em “a”, tecido esplênico normal de galinha não infectada por *Plasmodium gallinaceum*, negativo para pigmento de hemozoína, como visto em “b”. Galinhas não tratadas tem maior depósito de hemozoína, demonstrado na em “c”, que se mostram arranjadas de forma bem grosseira. Notar que galinhas tratadas com aminoguanidina não demonstram tais arranjos mas acúmulo menores e mais espaçado (e), o que pode ser facilmente observado na polarização (f). Barra 50µm.

15 Discussão

15.1 Sobrevivência

Animais tratados com AG tiveram mortalidade de 33%, enquanto animais não tratados 66%. Aqui houve clara correlação com os sinais clínicos, pois animais tratados, e que, portanto, tiveram iNOS/NO inibidos, desenvolveram sintomatologias mais brandas. Essa informação é coerente com o fato de que há expressão aumentada de iNOS em cérebros de crianças que desenvolveram MC fatal (Maneerat *et al.*, 2000).

Contraditoriamente, animais tratados com AG tiveram índices parasitêmicos maiores e sobreviveram mais. Este achado demonstra que no modelo aviário por *P. gallinaceum* em galinhas, há forte componente inflamatório/imune com participação do NO, uma vez que o grupo tratado apresentou menor gravidade da doença, mesmo tendo maior parasitemia.

15.2 Parasitemia

Em ambos os grupos de galinhas, tratadas ou não com AG, quanto maior a parasitemia, mais exacerbados os sinais clínicos. De fato, a parasitemia parece estar diretamente correlacionada com a sintomatologia e a sobrevivência tanto em animais tratados quanto não tratados com AG, quando analisados separadamente. Estes dados estão de acordo com Juhl e Permin (2002), pois o aumento da parasitemia é correlato com a complicação malárica. Quando confrontados, os grupos tratados e não tratados com AG, animais tratados tiveram picos parasitêmicos consideravelmente maiores que animais não tratados. O inibidor seletivo de iNOS, AG, já foi usado em outros estudos de infecções que envolvem a inflamação como fator complicador, com aumento da sobrevivência de animais. Neste propósito, Kahn *et al.* (1997) observaram que camundongos C57BL/6 infectados por *Toxoplasma gondii* e tratados com AG, apresentam menor inflamação tecidual, degeneração hepática e necrose intestinal e maior sobrevivência, embora com maior infecção tecidual. Os autores relacionam estes achados à menor produção de NO que, se por um lado leva ao maior parasitismo por diminuição da imunidade celular, por outro gera menos danos inflamatórios. Desta forma, frangos infectados com *P. gallinaceum* tratados com AG provavelmente apresentaram picos parasitêmicos mais elevados em virtude da diminuição do poder microbicida leucocitário, já que NO é importante no combate a parasitos do gênero *Plasmodium* (Sharma *et al.*,

2004). Este fato indica considerável importância do NO como fator microbicida contra *P. gallinaceum*. Em canários infectados com *P. relictum* foi demonstrado aumento da parasitemia quando os animais foram tratados com AG. Os autores relacionam o fato à independência entre multiplicação parasitária e aumento da parasitemia com o desenvolvimento da patogenia (Bichet *et al.*, 2012).

15.3 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos típicos de malária aviária apatia, palidez de pele e mucosa, anorexia e fezes esverdeadas, penas eriçadas e alteração da postura (Juhl e Permim, 2002) foram observados nos animais tratados e não com AG, mas de forma mais expressiva nos animais não tratados. A malária é uma doença que tem caráter multifatorial, dentre eles o componente inflamatório. Na malária humana, grande quantidade de citocinas e quimiocinas inflamatórias é produzida, possuindo efeito sistêmico ao desencadear patologia e gerar sinais clínicos (Shio *et al.*, 2010). Hemácias lisadas liberam substâncias que são pro-inflamatórias em nível sistêmico e neste processo estão incluídos os leucócitos, que são ativados e agem de forma efetora (Clark e Rocktt, 1994; Van der Heyde *et al.*, 2006). Essa resposta inflamatória é fisiológica e importante no controle da infecção, mas se exacerbada é maléfica. Neste contexto, é bastante razoável que a inibição de iNOS pela AG tenha causado menor resposta imune celular nos animais tratados, em virtude da diminuída produção de NO nos leucócitos, principalmente nos macrófagos. Este fato gerou uma resposta imune mais equilibrada nos animais tratados e assim menos inflamação sistêmica, o que foi compatível com os sintomas mais brandos e maior sobrevivência. O NO é importante mediador do processo inflamatório, pois é um potente vasodilatador (Gombos *et al.*, 2010). Portanto, além de ter diminuído a ação microbicida de macrófagos, a inibição de iNOS gerou menor concentração plasmática de NO, que por sua vez contribuiu para o abreviamento dos sinais clínicos decorrentes de inflamação.

15.4 Hematologia

A malária é uma doença infecciosa multifatorial, que causa patologia em vários sistemas, que em casos complicados leva ao óbito (Francischetti *et al.*, 2008). O estudo hematológico dos animais infectados por *P. gallinaceum* demonstrou alterações na linhagem vermelha, branca e trombocítica. O tratamento

com AG exerceu influência sobre estes parâmetros, o que reflete uma patogênese menos agressiva nos animais tratados com AG.

15.4.1 Eritrometria

Os índices eritrométricos foram diminuídos em ambos os grupos, mas de forma consideravelmente menos agressiva nos animais tratados com AG. Segundo Wright e Kreier (1969) parasitismo eritrocitário e a consequente perda de hemácias é a principal causa de óbito por *P. gallinaceum* na fase aguda. Além da hemólise propriamente dita, o parasitismo causa importantes alterações na superfície do eritrócito, havendo perda da permeabilidade seletiva conferida pela membrana íntegra (Nagao *et al.*, 2008). NO é descrito como agente inibitório da eritropoiese na malária humana por *P. falciparum* (De Souza *et al.*, 2008). No entanto, essa afirmação não pode ser transferida para o modelo de malária aviária usado aqui, pois as aves controle tratadas não apresentaram quedas das contagens, além das consequências benéficas aferidas nos animais infectados tratados com AG.

Animais infectados já apresentavam queda do número de hemácias em parasitemias inferiores a 10%, já demonstrando hemólises ou sugerindo que outros fatores estão envolvidos na perda de hemácias, pela baixa parasitemia. Nas malárias humanas, a anemia possui causas multifatoriais e não necessariamente está ligada à alta parasitemia, tendo, inclusive, mecanismos imunes envolvidos (Singh *et al.*, 2012). No caso de nosso trabalho, o fator imune pode estar envolvido, já que a queda dos valores hematimétricos foi menor nos animais tratados com AG, que tiveram suprimida a produção de NO. Desta forma, pode ter havido diminuição da capacidade microbicida dos macrófagos nos animais tratados, com menor fagocitose e inflamação, além de uma menor hemocaterese. Silveira *et al.* (2013) infectaram galinhas com *P. juxtannucleare*, que resulta em baixas parasitemias, normalmente abaixo de 3%. Os autores observaram queda no número de eritrócitos, além de depleção linfocitária na bursa de Fabricius e timo, evidenciando possível participação imune na patogênese na malária aviária.

Horn *et al.* (2011) descrevem o NO como agente agressor direto em relação à hemácia *in vitro*, causando deformidades estruturais. Isto, associado aos estudos de Nagal *et al.* (2008), sugere que animais tratados com AG possam ter tido hemácias menos propensas às deformações estruturais causadas por *P.*

gallinaceum, já que a produção de iNOS foi suprimida, com queda da produção de NO plasmático.

O NO também foi implicado como possível agente microbicida sendo produzido por hemácias humanas parasitadas por *P. falciparum* (Ghigo *et al.*, 1995). Como a hemácia não é uma célula fagocítica profissional, fica a dúvida se a morte do parasito em seu interior seria benéfico ou maléfico por si só, já que poderia encurtar a vida da hemácia gerando hemólise. Vale ressaltar que nos animais tratados foi observada maior parasitemia e menor hemólise. Podemos especular que nos animais tratados com AG, menor produção de NO pelas hemácias também poderia contribuir positivamente no quadro geral.

Em malária murina, foi demonstrado a existência de micropartículas (MP) derivadas das membranas plasmáticas de plaquetas, leucócitos, células endoteliais e eritrócitos. Essas micropartículas têm grande capacidade de estimulação inflamatória (Coltel *et al.*, 2006). Couper *et al.* (2010) demonstraram em modelo murino, que eritrócitos parasitados são as principais fontes de MP, e que isso contribui fortemente para o desenvolvimento da malária severa. Os mesmos autores demonstram ainda, *in vitro*, que as MP oriundas de hemólise dos eritrócitos parasitados têm maior ação inflamatória que o próprio eritrócito parasitado (sem hemólise) e que os outros tipos de micropartículas, são funcional e fenotipicamente diferentes desta. Essa informação pode ser contextual no presente trabalho, pois animais tratados com AG apresentaram menor hemólise. Grande produção de MP eritrocitárias é liberada no momento da hemólise (Salmon *et al.*, 2001). Logo, neste racional, animais tratados com AG provavelmente apresentariam menores concentrações de MP, já que apresentaram menor hemólise. Como a hemólise está implicada no desenvolvimento da patogênese e sinais clínicos (Ramos-Jr *et al.*, 2010), isso poderia explicar o quadro malárico mais agressivo desencadeado no grupo não tratado com AG.

15.4.2 Volume Corpuscular Médio - VCM

Os animais não tratados com AG tiveram aumento no VCM em parasitemias acima de 11%, de forma não homogênea. Ao passo que os animais tratados com AG somente tiveram variação no VCM quando a parasitemia alcançava níveis acima de 50%. Isso demonstra claramente o quanto a patogenia da doença foi

mais agressiva nos animais não tratados com AG, e está diretamente relacionada à maior perda de hemácias nos animais não tratados.

O VCM está relacionado ao tamanho das hemácias, sendo que a anisocitose pode ser resultado de uma agressão que resulte em forte hemólise (Leighton, 1985). Como os animais tratados tiveram menor perda de hemácias, pressupõe-se que tiveram menor demanda eritrocítica em virtude de menor hipóxia tecidual, e conseqüentemente seu VCM não aumentou tanto em relação ao controle. Por outro lado, a extensa hemólise ocorrida nos animais não tratados na fase aguda acarretou intensa hipóxia tecidual, com o aparecimento de formas mais jovens na circulação, e que, portanto, são maiores.

Segundo Pradhan (2009), a malária humana tem anemia multifatorial, onde hemólise e ausência de eritropoiese têm grande valor na patogênese da malária. Desta forma, a consequência é o desenvolvimento predominantemente de uma anemia normocítica normocrômica (Newton *et al.*, 1997). Aqui uma característica marcante, pois a malária aviária causada por *P. gallinaceum* apresentou anemia regenerativa macrocítica hipocrômica. Tal tipo de anemia em aves é considerada regenerativa, pois policromasia e anisocitose relaciona-se com forte resposta medular em virtude de perda (Mitchell e Jennifer, 2008).

15.4.3 Volume Globular ou Hematócrito – VG

Ambos os grupos apresentaram queda no VG em comparação com os seus controles, mas não diferenciaram entre si na fase aguda. Entretanto, na fase crônica o VG dos animais tratados foi maior, sugerindo proteção indireta da AG.

15.4.4 Hemoglobinometria

Os dois grupos de animais infectados demonstraram diferenças na concentração de hemoglobina já em baixas parasitemias, em comparação com os respectivos controles. Essa diferença com os controles permaneceu na cronificação. Entretanto, em parasitemias superiores a 50%, as concentrações de hemoglobina dos animais tratados com AG foram maiores que os valores dos animais não tratados. Parasitos do gênero *Plasmodium* utilizam a hemoglobina como fonte energética e detoxificam a fração heme gerando o pigmento hemozoina (Shio *et al.*, 2010). Desta forma, animais não tratados tiveram suas hemácias

destruídas de forma mais intensa em altas parasitemias, e não conseguiram suprir essa destruição por sua capacidade fisiológica de síntese de hemoglobina.

15.4.5 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média – CHCM

O CHCM de animais infectados não tratados somente mostrou queda em relação ao controle acima de 11% de parasitemia, enquanto os animais infectados tratados somente demonstraram tal alteração em parasitemias superior a 21%. Esses resultados indicam que animais infectados não tratados tiveram hemólise mais extensa com menor parasitemia em relação a animais tratados com AG, o que inicialmente já gera uma hipocromia fisiológica. Animais não tratados tiveram hemácias jovens lançadas na circulação mais precocemente. Essas hemácias são grandes em relação às hemácias maduras, o que resulta na diminuição do CHCH. Entretanto, por outro lado, animais não tratados tiveram mais perda de hemoglobina, como mostrado previamente, que pode influenciar neste caso.

Animais infectados tratados com AG tiveram extensa perda eritrocítica, mas em momento posterior, quando mais hemácias, jovens e grandes, foram lançadas na circulação, gerando a observada diminuição do CHCM. Em parasitemias acima de 50%, os valores de CHCM dos animais tratados com AG foram maiores, o que é diretamente correlato com seu menor VCM. Aqui se deve fazer uma ressalva, pois os animais infectados não tratados morreram com parasitemia média de 55%, enquanto animais tratados suportaram parasitemias superiores a 70%. Portanto, as funções fisiológicas dos animais infectados não tratados possivelmente estavam bastante debilitadas, dificultando a síntese de hemoglobina. Na cronificação, os sobreviventes dos dois grupos infectados apresentaram-se em normalidade.

15.4.6 Morfologia e infecção eritrocitária

O aumento da parasitemia gerou alterações eritrocíticas, correlacionadas com as observações do eritrograma. Hemácias maiores, arredondadas, binucleadas e com citoplasma basofílico foram observadas. Num contexto de perda de hemácias em aves, eritrócitos binucleadas são associadas com forte resposta em anemias regenerativas (Capitelli e Crosta, 2013).

Quanto maior a parasitemia, mais frequentes foram essas observações, em decorrência do processo hemolítico de hemácias. Este fato é comprovado com o aumento de visualização de hemácias em divisão encontradas com a subida da

parasitemia e consequentes alterações hematológicas. A infecção por *P. gallinaceum* em galinhas acarretou, além da diminuição da contagem eritrocítica, aumento do VCM e diminuição da CHCM. Desta forma, a anemia é caracterizada como macrocítica hipocrômica (Capitelli e Crosta, 2013).

Parasitos em hemácias jovens e maduras foram observados. Infecção em hemácias de idades variadas é uma característica de espécies de *Plasmodium* que realizam grandes parasitemias, como *P. falciparum* e *P. knowlesii* (Lee *et al.*, 2013). Altas parasitemias alcançadas tem implicação como fator relacionado à maior patogenia (Daneshwar *et al.*, 2009). Esse achado de certa forma fomenta a importância do uso deste modelo experimental, tendo em vista que *P. gallinaceum* é semelhante evolutivamente a *P. falciparum*, causador da malária mais letal no homem (McCutchan *et al.*, 1996; Roy e Irimia, 2008).

15.5 Leucograma

A malária é uma infecção sistêmica, que está correlacionada com alteração no sistema imune e vascular (Francischette *et al.*, 2008). Na fase aguda da doença, houve tendência a leucopenia em ambos os grupos infectados, tratados ou não com AG. Nas malárias humanas, esse achado está presente, mas não há alteração leucocitária característica, pois a patogênese varia dentro da mesma espécie, podendo inclusive não haver qualquer alteração (Rodriguez-Morales, 2005). Apesar do intenso parasitismo observado, não houve significância estatística na contagem leucocitária, o que leva a crer que nas infecções por *P. gallinaceum*, não há uma situação de leucopenia gravíssima. O que é correlato com as malárias humanas, na qual a leucopenia pode ser leve ou inexistente, havendo apenas queda nas contagens em decorrência da considerável migração tecidual dos leucócitos que pode ocorrer. As leucocitoses, por outro lado, são incomuns na malária humana e correlacionadas com infecções secundárias (MacKenzie *et al.*, 2005). Em galinhas, Silveira *et al.* (2009) observaram leucocitose na infecção por *P. juxtannucleare*, mesmo sem alterações clínicas ou altas parasitemias, indicando um claro mecanismo imune na patogênese desta espécie, que não realiza altas parasitemias.

Em pacientes humanos na Venezuela, Jadhav *et al.* (2003) observaram mais casos individuais de leucopenia em pacientes portadores de *P. vivax* que por *P. falciparum*, e que as médias das contagens leucocitárias na população infectada

por *P. falciparum* eram maiores. Outros estudos, entretanto, demonstram que as contagens leucocitárias são variáveis entre as duas espécies, podendo *P. falciparum* levar a maior queda das contagens leucocitárias (MacKenzie *et al.*, 2005). Tendo em vista o fato de que *P. falciparum* realiza grande parasitemia e *P. vivax* somente parasita hemácias jovens, ressalta-se um componente imune que pode se sobrepor à tão somente densidade parasitária (Matsumoto *et al.* 2000). Desta forma, é provável que a tendência a leucopenia nos animais infectados tenha um componente imune associado à migração tecidual de leucócitos e posterior gasto, sem reposição adequada.

15.5.1 Eosinófilos

A contagem de eosinófilos diminuiu ao longo do desenvolvimento da patologia, mas voltou à normalidade na fase crônica. Não há na literatura trabalhos que demonstrem a importância dessa linhagem celular em infecções de aves incluindo a por *Plasmodium* spp. em galinhas. Desta forma, é provável que sua contagem específica tenha diminuído proporcionalmente à diminuição da contagem leucocitária global. No entanto, Kurtzhals *et al.* (1998) estudaram casos de crianças em primo infecção por *P. falciparum* e demonstraram que nas infecções não sintomáticas, eosinofilia é um achado importante. Porém, em infecções graves agudas, observou eosinopenia, e atribuíram isso ao sequestro tecidual numa escala muito maior que a produção. Tais indivíduos apresentam eosinofilia 30 dias após a cura. De posse desses achados, os autores levantaram a hipótese de que eosinófilos poderiam ter significância na prevenção de complicação malárica. Algo similar pode acontecer com as galinhas infectadas pelo *P. gallinaceum* sugerindo que esse tipo celular tem alguma importância nessa patologia.

15.5.2 Linfócito

No início do processo infeccioso não houve alteração linfocitária, mas houve queda na contagem desse tipo celular em ambos os grupos em grandes parasitemias, voltando ao normal na cronificação. *Plasmodium* secreta uma proteína denominada PMIF, com estrutura e função parecida com o fator de inibidor de migração de macrófagos (MIF). A ligação de PMIF no receptor de MIF (CD74) em células dendríticas induz a liberação de citocinas inflamatórias capazes de estimular a conversão de linfócitos TCD4 em T efetores e diminuir a formação de

células de memória (Leng *et al*, 2003). Como os linfócitos TCD4 tem vida mais curta por serem mais susceptíveis à apoptose via Bcl2, há interferência negativa na formação de linfócitos de memória. Ademais, PMIF induz produção de IL-12 e TNF- α durante a fase eritrocítica, que estimula apoptose de linfócitos pelo sistema Bcl2. É possível que outras subpopulações linfocíticas sejam afetadas e desenvolvam apoptose precoce na infecção malárica (Sun *et al*, 2012). Neste contexto, Butler *et al.* (2012) relatam a possibilidade de exaustão de TCD4 na malária. Linfócitos em contato com PMIF secretam menos IL-2, citocina que tem função de estímulo vital e mitogênico para linfócitos e este é mais um fator que contribui negativamente para estas células. Apesar de não atuar em TCD8, a supressão da atividade de TCD4 por PMIF poderia influenciar na sua ativação (Sun *et al.*, 2012). O mecanismo envolvido na depleção linfocitária observada nesse trabalho pode estar relacionado com produção de MIF por *P. gallinaceum*, como visto acima. Não existem dados literários que evidenciam ou não o papel de linfócitos na infecção aviária por *P. gallinaceum*. Entretanto, estudo com outro parasito de galinhas, *P. juxtancleare*, demonstra importante depleção linfocitária de timo e baço (Silveira *et al.*, 2013). Esses autores não realizaram leucograma, mas fica implícita a llinfocitopenia também na infecção por *P. juxtancleare*. Essa patogênese provavelmente está presente na infecção por *P. gallinaceum*, pois como será mostrado adiante, houve depleção linfocitária esplênica.

15.5.3 Monócitos

Houve tendência à queda dos valores monocíticos no grupo não tratado com AG em baixas parasitemias, mas uma tendência ao aumento em altas parasitemias. Em trabalhos envolvendo malária humana, cita-se a hemozoina como um agente inflamatório de ação direta e como atividade quimiotóxica de monócitos para o tecido. Isso porque dentre outras citocinas, hemozoina induz produção de MCP-1, que é altamente quimioatrativa para monócitos (Jaramill *et al.*, 2004). Como mostrado adiante, maiores inflamações são observadas no fígado e baço de animais não tratados com AG, que apresentam maior deposição de hemozoina. Por isso, fica implícito que a maior tendência a monocitose no grupo não tratado possa ser um reflexo da situação tecidual mais grave.

Neste trabalho já foi implicada o controle da inflamação causada por AG, e uma tendência à exacerbação da mesma em animais não tratados, que tem mais

hemólises. Suporta esta afirmação o fato de que hemólises podem estar diretamente implicadas em casos de inflamação aguda (Almeida *et al.*, 2013) e na patogênese malárica (Percário *et al.*, 2012).

Na malária, pode haver gasto tecidual, que leva à queda dos leucócitos circulantes (Rodriguez-Morales, 2005). Como nos animais não tratados houve mais hemólise, mais hemozoína foi dispersa na corrente sanguínea e conseqüente maior acúmulo deste cristal nos tecidos destes animais. A hemozoína tem grande capacidade inflamatória (Shio *et al.*, 2010) e é altamente quimiotóxica para monócitos e ativador do sistema fagocítico mononuclear (Metzger *et al.*, 1995). Isso explica a tendência de monocitose somente nos animais não tratados com AG em altas parasitemias. Esses dados serão abordados novamente na histopatologia do fígado e baço. A capacidade da hemozoína em ativar monócitos foi notada pela mudança morfológica dos monócitos. No transcorrer da doença, os monócitos se tornaram mais ativos, com mais vacúolos e mais impregnados com corantes.

Monócitos foram infectados por *P. gallinaceum*, o que é comum em malárias humanas (Goldie e Roth, 1990). A fagocitose de hemozoína altera as funções celulares, diminuindo o sucesso de novas fagocitoses e a atividade microbicida (Taramelli *et al.*, 1995). Há ainda falha na resposta ao IFN- γ e na expressão de MHC-II e conseqüente déficit na apresentação antigênica, resultando em imunossupressão (Schwarzer *et al.*, 1998). Não houve diferença entre positividade para hemozoína em monócitos de animais tratados e não tratados com AG. Entretanto, provavelmente o tratamento tenha diminuído os efeitos pró-inflamatórios gerados pela hemozoína, já que nos animais tratados não houve tendência ao aumento na contagem de monócitos em altas parasitemias.

15.5.4 Heterófilos

Ambos os grupos demonstraram contagem similar de heterófilos, que diminuiu a partir de 30% de parasitemia e se normalizou na fase crônica. Aqui não houve qualquer sinal de atuação da droga no que diz respeito às contagens ou morfologia entre os grupos. Silveira *et al.* (2009) não observaram variações nas contagens heterofílicas de galinhas infectadas por *P. juxtannucleare*. Entretanto, esse modelo aviário desencadeia processo patológico bastante brando quando comparado com a infecção por *P. gallinaceum*. Nazifi *et al.* (2008) não demonstrou qualquer alteração hematológica em galinhas naturalmente infectadas por *P.*

gallinaceum. Aqui faz-se uma ressalva, pois tais animais possivelmente estavam em fase crônica da doença. Fato também é que as doses infectantes certamente podem contribuir para o processo patológico.

Em malária humana aguda por *P. falciparum*, pode haver neutropenia (Ladhani *et al.* 2002) em virtude do sequestro vascular (Picot, 2006), extenso gasto tecidual e migração celular (Dale e Wolff, 1973). Desta forma, a queda heterofílica observada na fase aguda em ambos os grupos pode ser atribuída à intensa demanda tecidual. A baixa ocorrência de neutrófilos em bastão observada neste trabalho é consensual com os estudos de Lima-Jr *et al.* (2012), que não observaram correlação entre aumento de bastonetes e a subida da parasitemia em infecções por *P. falciparum* e *P. vivax*.

Granulações tóxicas foram observadas nos dois grupos de animais infectados, processo este correlacionado com o aumento da parasitemia. Sabe-se que as granulações tóxicas são atribuídas à agressividade do processo infeccioso (Latimer *et al.*, 1988). Na fase crônica, esse fato foi raramente observado. O achado de heterófilos tóxicos não é comum em estudos com malária aviária, não tendo sido ainda observado. Entretanto, ocorre na malária humana grave e está associada a gravidade do processo infeccioso (Baker *et al.*, 2008). Em aves, alterações morfológicas dos heterófilos refletem de uma forma muito fidedigna o grau de agressão de uma doença infecciosa (Van der Heiden, 1994)

15.6 Trombócitos

A malária é uma infecção em que as coagulopatias podem estar presentes, inclusive com quadros de coagulação intravascular disseminada – CID, quando há queda no número de plaquetas em consequência do grande gasto (White, 1996). A queda da contagem de trombócitos caiu drasticamente nos animais não tratados com AG, mesmo os que apresentam baixa parasitemia, já indicando coagulopatia em momentos iniciais. A trombocitopenia persistiu desta forma durante o curso da infecção, com diminuição da contagem com a subida de parasitemia, e somente retornou à normalidade na cronificação. A queda do número de trombócitos é uma característica bastante corriqueira na malária humana (Daneshvar *et al.*, 2009) e normalmente é mais evidente em indivíduos com alta parasitemia (Lima-JR *et al.*, 2012).

A trombocitopenia acompanhada de coagulopatia está associada à malária humana, particularmente por *P. falciparum*. Contribuem para a trombocitopenia a diminuição do tempo de vida, destruição por fatores imunes, consumo, sequestro esplênico e baixa produção (Beare *et al.*, 2006). Como a AG diminui a produção de NO, que dentro deste contexto tem importante função imune e inflamatória, é provável que a droga tenha contribuído para a manutenção das contagens normais de trombócitos através do abrandamento da resposta imune e da inflamação. Essas avaliações estão de acordo com Ghosh e Shetty (2008), que correlacionam altos níveis de NO plasmático à perda da capacidade adesiva das plaquetas, piorando o quadro de coagulopatia na malária humana.

Com o transcorrer da parasitemia em ambos os grupos, foram observados trombócitos binucleados, grandes, ativados e com grandes vacúolos. Tais células foram cultivadas para confirmação de sua identidade. De fato, em cultura os trombócitos de animais infectados apresentaram diferenças após a aderência em placa. Em aves, essas características indicam imaturidade celular e ocorrem em consequência de grande perda. Essas alterações podem estar associadas à infecções sistêmicas e coagulação intravascular disseminada (D'Aloia *et al.*, 1994). Na malária humana, as alterações morfológicas em decorrência da infecção são correlacionadas com diminuição das funções das plaquetas (Angchaisuksiri, 2014).

Neste trabalho foi observado parasitismo por *P. gallinaceum* em trombócitos de animais tratados e não tratados com AG. O parasitismo em trombócitos já foi relatado em galinhas infectadas por *P. juxtannucleare* (Silveira *et al.*, 2009) e em plaquetas na malária humana (McMorran *et al.* 2009), tendo esta última atividade plasmodicida *in vitro*, contrastando com o estudo de Whrite (2005). Porém, no presente estudo provavelmente houve invasão ativa do parasito no trombócito, pois trombócitos de galinhas possuem baixa atividade fagocítica (DaMatta *et al.*, 1999). Entretanto, alguns trombócitos parasitados por *P. gallinaceum* apresentaram grandes vacúolos envolvendo o parasito, o que sugere fagocitose ativa.

15.7 Bioquímica Sérica

15.7.1 Alanino amino transferase - ALT

Pouca variação na produção de ALT ocorreu no início da fase aguda, somente ligeira queda nos animais infectados. Em seguida, houve uma tendência ao aumento das concentrações em ambos os grupos no transcorrer da fase aguda. Pacientes humanos infectados por *P. falciparum* podem aumentar em 10 vezes as concentrações de ALT, denotando considerável dano hepático (Abro *et al.*, 2009). Entretanto, há de se ponderar que as infecções humanas são naturais, oriundas de picada do mosquito e inoculação de esporozoíta, que inicialmente carrega uma fase extraeritrocítica no fígado, causando lesão direta nos hepatócitos (Cui *et al.*, 2009). Por outro lado, *P. gallinaceum* não realiza tal ciclo exoeritrocítico hepático quando inoculado através de hemácias infectadas (Dubin, 1954).

Na fase crônica, animais não tratados apresentaram significativamente maiores concentrações séricas de ALT que animais tratados. A tendência ao aumento de ALT nos animais na fase aguda indica dano hepático. O não aumento de ALT em animais tratados na fase crônica indica proteção hepática pelo tratamento, que será correlacionado adiante na histopatologia do fígado.

15.7.2 Aspartato Amino Transferase – AST

AST somente teve aumento significativo em altas parasitemias nos animais não tratados com AG. Esse achado denota menor dano hepático nos animais tratados com AG na fase aguda e está diretamente correlacionado com a histopatologia. Aumento de AST em infecções causadas por *P. falciparum* são frequentes, e podem ocorrer sem ou com hepatomegalia (Patwari *et al.*, 1979).

15.7.3 Lactato Desidrogenase – LDH

LDH teve tendência ao aumento da concentração sérica paralelamente à subida da parasitemia. Esses dados são parecidos ao que ocorre na malária humana, em que LDH normalmente está aumentada e é considerada uma molécula importante na avaliação de lesão hepática (Garba e Ubom, 2005). Provavelmente um número maior de animais experimentais gerasse um dado estatístico confirmatório, embora a tendência seja sugestiva de dano hepático.

15.7.4 Colesterol

Novamente, foi observada tendência ao aumento conforme a parasitemia crescia. O aumento do colesterol em aves está relacionado à injúria hepática, fibrose hepática e hiperplasia de ducto biliar (Thrall *et al.*, 2007). Maiores concentrações de colesterol plasmático estão relacionadas à malária humana, associada ao dano hepático (Chukwuocha e Eke, 2011).

15.7.5 Ureia

A ureia teve tendência a elevação em ambos os grupos, acompanhando a subida da parasitemia. Na malária humana, o aumento dos índices de ureia não é uma constante, embora presente em pacientes que desenvolvem insuficiência renal aguda. Esse quadro pode ser fatal (Hooda *et al.*, 2007), acompanhado de grande elevação da uremia (Sahu *et al.*, 2011) embora Rasheed *et al.* (2009) tenham observado níveis médios de ureia normais em indivíduos infectados por *P. falciparum*, *P. vivax* e em co-infecção. Os mesmos autores não consideram a ureia como marcador de malária humana. Apesar da ausência de significância estatística, os animais parasitados não tratados com AG em altas parasitemias apresentaram níveis de uréia bastante superiores a 5mg/dL, considerado normal para galinhas (Thrall *et al.*, 2007). Se analisarmos os dados humanos supracitados, onde o aumento de ureia ocorre, mas não de forma constante, pode-se chegar à conclusão de que o aumento da ureia é um fator importante na malária aviária, mas relacionado à fatores individuais que precisam ser melhor analisados. Portanto, provavelmente ureia tenha concentração sérica aumentada em virtude de lesão renal, particularmente nos animais não tratados.

15.7.6 Ácido Úrico

A mensuração do ácido úrico é uma boa estratégia de análise da função renal em aves. Deste metabólito hepático, 90% é eliminado via urina nestes animais, e sua secreção ocorre independentemente da hidratação. Valores aumentados indicam nefropatia, e que há perda de 70% da função renal (Lumeij e Overduin, 1990; Lumeij e Remple, 1991).

Apesar da tendência ao aumento na fase aguda acompanhada de altas parasitemias, nenhum grupo apresentou médias superiores a esta medida. Entretanto, animais não tratados ficaram próximos deste limiar em altas

parasitemias, o que poderia indicar maior lesão renal. Além de possível maior lesão sistêmica, pois na malária humana, o aumento de ácido úrico está relacionado à inflamação e severidade (Lopera-Mesa *et al.*, 2012). A alta variabilidade dentro dos grupos, refletindo características individuais pode ter contribuído para isto. Provavelmente um número maior de indivíduos analisados gerasse alteração significativa, pois diminuiria o desvio padrão.

15.7.7 Creatinina

Dosagens séricas de creatinina mantiveram-se estáveis ao longo do experimento em animais tratados ou não por AG. Casos fatais de malária humana por complicações cerebrais e pulmonares frequentemente estão acompanhados com aumento de creatinina (Buldol *et al.*, 1982). No presente trabalho, não foi observada qualquer alteração nos níveis de creatinina, sugerindo que creatinina sérica não é um indicativo de gravidade de malária aviária.

15.8 Quantificação de Óxido Nítrico Plasmático

Animais tratados com AG não tiveram alteração da concentração de NO durante todo o experimento, validando a inibição de iNOS pela AG. De forma diferente, animais não tratados com AG tiveram aumento da concentração de NO durante todo o experimento. Esses dados provavelmente correlacionam-se com um processo inflamatório mais exacerbado nestes animais, já que iNOS é um agente pró-inflamatório na malária humana (Ghosh e Shetty, 2008). Sharma *et al.* (2004) descrevem NO como importante agente microbicida contra *P. vivax*. Entretanto, NO tem efeito controverso na patogênese malárica, pois sua atividade também é importante na prevenção de patologias vasculares. Isso ocorre porque após hemólises, hemoglobina livre pode catalisar reações oxidativas nos tecidos. Este fato gera sítios de consumo de NO, e nestes casos específicos a grande queda de NO se relaciona com agravamento do quadro (Miller *et al.*, 2013). Yeo *et al.* (2010) demonstraram este fato em uma criança com profunda anemia, altos níveis de hemoglobina e baixas concentrações plasmáticas de NO. Como resultado do baixo NO, o paciente apresentou séria vasoconstrição pulmonar. Nestes casos, a hemoglobina age como um verdadeiro eliminador de NO, o que aumenta a patogênese (Miller *et al.*, 2013). Porém, tais estudos não se aplicam à patogenia da malária aviária, pois foi demonstrado aqui que a inibição parcial de NO aumenta a

sobrevida dos animais infectados. Além disso, foi demonstrado que a droga não alterou a arquitetura histológica dos animais controle.

AG foi utilizada eficazmente em galinhas em estudos fisiológicos tendo em vista ação vascular (Wideman *et al.*, 2006), mas não abordando um cenário infeccioso. Khan *et al.* (1997) utilizaram AG em camundongos infectados por *T. gondii* e observaram menores concentrações de NO, embora com maior parasitismo e menor dano tecidual. Neste trabalho, AG foi utilizada com ação eficaz no modelo aviário de malária, causado por *P. gallinaceum*. A droga causou redução de NO nos animais tratados, aumento da parasitema, melhora dos parâmetros hematológicos, histopatológicos e de mortalidade. Portanto, assim como o autor supracitado, neste trabalho também pode-se atribuir como ação indireta da droga o controle do mecanismo imune / inflamatório, já que o autor acima utilizou uma linhagem de camundongo que geram forte resposta inflamatória frente a *T. gondii*.

15.9 Histopatologia

15.9.1 Histopatologia encefálica

Apesar da diferente intensidade da manifestação clínica entre animais tratados e não com AG, o mesmo não foi percebido no tecido encefálico. Neste órgão, as lesões estavam presentes, mas de maneira igual entre grupos. Dentre as malárias humanas, *P. falciparum* causa a mais grave infecção e está relacionado frequentemente ao desenvolvimento de MC. Entretanto, mesmo em casos de MC confirmada, há grande heterogeneidade entre campos visuais observados do cérebro, sendo necessário o desenvolvimento de um método aprimorado para tal (Milner *et al.*, 2013). Não se descarta essa dificuldade para chegar a uma conclusão mais precisa em nosso trabalho.

Animais parasitados tinham capilares com grande quantidade de hemácias parasitadas e com depósito de hemozoína, que é consequência da ruptura de esquizontes (Milner *et al.*, 2013). Foram observados edemas e fatores relacionados, como aumento do espaço de Virchow-Robin, ectasia vascular e aumento de espaço entre pia-máter e dura-máter, deslocando a aracnoide, além de grande quantidade de leucócitos na microcirculação. Estes dados estão de acordo com Manning *et al.* (2012), que observaram a região cortical aumentada por edema, além de migração de neutrófilos em regiões perivasculares de paciente co-infectado por *P. falciparum* e *P. vivax*. Assim como Manning *et al.* (2012), a

citoaderência não foi um achado significativo no presente estudo. Ainda na fase aguda, frequentemente foi observada pequena quantidade de hemácias nos capilares, estando relacionado com a anemia ocorrida. Foram observadas formas extraeritrocíticas no encéfalo. Segundo Paraense (1946) as formas parasitárias livres no tecido nervoso são bastante danosas, pois causam lesão direta no tecido.

Na fase crônica foram observadas gliose cicatricial nos dois grupos. Este achado reflete uma ativação dos astrócitos, que pode ocorrer em consequência de lesão no SNC, onde podem estar incluídos isquemia, inflamação, estresse oxidativo e ruptura da barreira hemato-encefálica (Pekny e Nilsson, 2005).

15.9.2 Necrópsia e Histopatologia Hepática

Os animais infectados apresentaram hepatomegalia e fígado enegrecido, de acordo com Juhl e Permin (2002). Hepatomegalia, mas não escurecimento do órgão, também foi observada por Silveira *et al.* (2013) em galinhas infectadas por *P. juxtannucleare*. Animais infectados apresentaram fígado escuro, tendendo ao negro. Este achado está relacionado com as fezes diarreicas esverdeadas observadas nos animais parasitados, em decorrência do acúmulo de biliverdina na circulação. Este evento provavelmente tem uma implicância pré-hepática em decorrência das hemólises, mas também por uma possível perda da função hepática. O fígado mais escuro observado nos animais não tratados poderia ter uma relação com a maior hemólise observada neste grupo.

Característica global nos animais infectados foi a hepatite predominantemente mononuclear com infiltrado inflamatório misto, entretanto mais agressivos nos animais não tratados com AG. Este fato é correlato com as alterações clínico-laboratoriais citadas até agora neste trabalho, quando se compara animais tratados e não, já que AG teve uma ação anti-inflamatória nos demais parâmetros. Em infecções por *P. juxtannucleare*, Silveira *et al.* (2013) observaram hepatite com pequena a moderada infiltração linfocítica, sem acúmulo de hemozoína. O presente trabalho é diferenciado neste aspecto, pois utiliza uma espécie de *Plasmodium* que realiza grandes parasitemias, resultando em extensas hemólises e acúmulo de hemozoína, tanto no leito vascular quanto fagocitada por células de Kupffer.

Como a hemozoína tem atividade pró-inflamatória para neutrófilos e monócitos (Jaramillo *et al.*, 2004), provavelmente este fator tenha influenciado na

ocorrência de hepatite de caráter misto, predominantemente mononuclear. Seguindo este racional, chega-se à conclusão que os infiltrados mais agressivos nos animais não tratados estão relacionados ao maior acúmulo do pigmento malárico no fígado destes animais. A maior hemólise causada nos animais não tratados, e consequente maiores concentrações de hemoglobina solúveis acarretam maiores depósitos da fração heme no fígado, que é bastante quimiotóxica para neutrófilos (Dey *et al.*, 2012). Este fato também pode ter contribuído para o maior infiltrado inflamatório nos animais não tratados.

No parênquima hepático e nos infiltrado inflamatórios, frequentemente se observou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular programada. Tem sido associado apoptose com infecções graves por protozoários, principalmente em leucócitos (Gavrilescu e Denkers, 2003). Situação vista como benéfica, uma vez que essas células são mais facilmente removidas e abrevia-se a possibilidade de necrose, que pioraria o processo infeccioso (Messmer e Pflerschifter, 2000). Essas alterações não foram identificadas na infecção por *P. juxtannucleare* em galinhas (Silveira *et al.*, 2013). Os achados de Kemp *et al.* (2002) relacionaram a malária humana por *P. falciparum* com grande quantidade de marcadores apoptóticos em células mononucleares, que apresentaram altos níveis de FasL, que decrescem no período de recuperação da doença.

Hepatócitos apoptóticos foram identificados na presente infecção, mas previamente foram descritos na infecção malárica humana. Neste caso, a infecção por *Plasmodium* causa estresse oxidativo. Esse acontecimento gera aumento da expressão de Bax e diminuição de Bcl2, aumentando a translocação de Bax para a mitocôndria. Esse acontecimento aumenta a permeabilidade dos poros, resultando em liberação de proteínas indutoras de apoptose no citosol. Há ativação da caspase-3 pelo citocromo C, e consequente apoptose (Guha *et al.*, 2006). Esses acontecimentos podem ter implicância também na malária aviária, mas estudos mais especializados poderiam trazer a resposta. Entretanto, é provável que haja correlação, pois as hemólises são importantes na infecção por *P. gallinaceum*, e uma consequência dela é o estresse oxidativo.

Necrose de coagulação foi observada frequentemente nos animais infectados. Este tipo de necrose é atribuída à severa isquemia, após grave hipóxia, e caracterizada pela relativa preservação da estrutura celular, com ausência do núcleo. A tendência é a consequente lise deste arcabouço celular gerando

componentes inflamatórios e com grande capacidade quimiotóxica. Posteriormente, pode haver deposição de tecido conjuntivo fibroso, trazendo prejuízo ao funcionamento do órgão, pois este tem função unicamente estrutural. Segundo Miller *et al.* (2013), obstrução de microcirculação podem ocorrer na malária e são causadas por aglomeração de células sanguíneas no leito vascular, gerando vasculite e hipóxias. Portanto, supõe-se que as hipóxias em nível de fígado foram mais importantes nos animais não tratados, pois somente eles apresentaram necrose de coagulação.

Na fase crônica, animais infectados não tratados ainda apresentaram hepatites de caráter leve, com pequenos infiltrados inflamatórios mistos com predominância de heterófilos. Os animais tratados com AG observados não apresentaram essa alteração. Ainda havia tumefação difusa e degeneração hidrópica em ambos grupos, relacionadas com inflamação e hipóxia, respectivamente. Depósitos de hemozoína ainda se faziam presentes. As maiores lesões hepáticas na fase aguda da infecção nos animais não tratados com AG ainda repercutiram na fase crônica (dados não mostrados).

15.9.3 Necrópsia e Histopatologia do Baço

O tecido esplênico demonstrou alteração estrutural em ambos os grupos infectados. Animais apresentaram esplenomegalia, tendo os animais tratados baços em maior tamanho. Esplenomegalias importantes são observadas em malária humana, podendo haver ruptura do órgão (Machado Siqueira *et al.*, 2012). Neste estudo, não foi observada ruptura esplênica nos animais examinados. Mas isso não afirma que não possa haver essa lesão, uma vez que nem todos os animais mortos foram necropsiados.

Nos animais não tratados com AG, foram evidenciadas esplenite heterofílica discreta e depleção linfocitária moderada. Na malária humana fatal por *P. falciparum*, o aumento de neutrófilos na polpa vermelha é um achado importante (Urban *et al.*, 2005), mas não ocorre na infecção experimental por *P. juxtannucleare* em galinhas (Silveira *et al.*, 2013), refletindo maior ação patogênica no baço por parte de *P. gallinaceum* em relação a *P. juxtannucleare*. Os animais tratados com AG não demonstraram esplenite heterofílica, o que reflete uma proteção esplênica.

Depleção linfocitária moderada e acentuada foram visualizadas nos animais não tratados e tratados com AG, respectivamente. Houve alteração da arquitetura

tecidual, com perda da delimitação entre polpa branca e vermelha. Na malária humana, estudos mostram diminuição de linfócitos B e algumas subpopulações de linfócitos T, com preservação da delimitação entre polpa branca e vermelha (Urban *et al.*, 2005). Silveira *et al.* (2013) também relacionaram depleção linfocitária no baço à infecção por *P. juxtannucleare*. A maior depleção linfocitária nos animais tratados com AG provavelmente tenha implicância local, uma vez que as contagens linfocitárias não tenham diferenciado entre grupos. Na fase crônica, o único achado histopatológico foi o persistente acúmulo de hemozoína, embora diminuto.

16 Conclusão

Galinhas infectadas com *P. gallinaceum* desenvolveram a patogênese clássica da infecção, com anemia, sinais clínicos comuns da doença e com alta mortalidade. Tratamento com AG gerou menor produção de NO, já que a droga inibe a atividade de iNOS. Menores concentrações plasmáticas de NO no grupo tratado foram correlacionadas com patogênese menos agressiva, embora animais tratados tenham desenvolvido maior parasitemia. O tratamento acarretou sinais clínicos mais brandos, menor anemia e trombocitopenia, menores alterações histológicas e maior sobrevida. Estes resultados mostram que NO tem importância na patogênese malárica em galinhas. E que a infecção eritrocitária em si é menos danosa que as consequências da hemólise ou da ação microbicida do NO sobre os parasitos.

Bibliografia

- Abro, A.H., Ustadi, A.M., Abro, H.A., Abdou, A.S., Younis, N.J., Akaila, S.I. (2009). Jaundice with hepatic dysfunction in *P. falciparum* malaria. *Journal of College of Physicians and Surgeons Pakistan* 19: 363-366.
- Alavi, Y., Arai, M., Mendoza, J., Tufet-Bayona, M., Sinha, R., Fowler, K., Billker, O., Franke-Fayard, B., Janse, C.J., Waters, A., Sinden, R.E. (2003) The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *International Journal for Parasitology* 33:933-943.
- Almeida, C.B., Werneck, C.C., Vicente, C.C., Costa, F.T., Costa, F.F., Conran, N. (2013) Hydroxyurea reduces leukocyte interactions with the vessel wall in a haemolytic mouse model via a possible NO/cGMP-mediated effect. *BMC Pharmacology and Toxicology* 14: (Suppl 1) P2.
- Andrade, B.B., Reis-Filho, A., Souza-Neto, S.M., Clarencio, J., Camargo, L.M., Barral, A., Barral-Netto, M. (2010) Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal* 9: 13.
- Andreasen, C.B., Latimer, K.S., Harmon, B.G., Glisson, J.R., Golden, J.M., Brown, J. (1991) Heterophil function in healthy chickens and in chickens with experimentally induced staphylococcal tenosynovitis. *Veterinary Pathology* 28: 419-427.
- Angchaisuksiri, P. (2014) Coagulopathy in malaria. *Thrombosis Research* 133: 5–9.
- Atkinson, C.T., Dusek, R.J., Woods, K.L., Iko, W.M. (2000) Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected *Hawaii amakihi*. *Journal of Wildlife Diseases* 36: 197-201.
- Aviado, D.M. (1969) Chemotherapy of *Plasmodium berghei*. *Experimental Parasitology* 25: 399–482.
- Baêta, F.C., Souza, C.F. (1997) *Ambiência em edificações rurais: Conforto animal*. Viçosa: UFV, 1997. 246p.
- Baker, V.S., Imade, G.E., Molta, N.B., Tawde, P., Pam, S.D., Obdofin, M.O., Soloman, A.S., Egah, D.Z., Iya, D., Afolabi, B.B., Baker, M., Ford, K., Ford, R., Roux, K., Kelle, T.C.S. (2008) Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malaria Journal* 7: 41.
- Beare, N.A., Taylor, T.E., Harding, S.P., Lewallen, S., Molyneux, M.E. (2006) Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 790–797.
- Bichet, C., Cornet, S., Larcombe, S., Sorci, G. (2012) Experimental inhibition of nitric oxide increases *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) parasitaemia. *Experimental Parasitology* 132: 417–423.
- Bogdan, C. (1998) Burden, features, and outcome of neurological involvement in acute falciparum malaria in kenyan children. *Journal of Experimental Medicine* 187: 1361-1365.
- Bounous, D.I., Stedman, N.L. (2000) *Normal Avian Hematology: Chicken and Turkey*. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed, Philadelphia, Lippincot, Williams e Wilkins, 2000, p.1147-1154.

- Brumpt, E. (1936a) Étude expérimentale du *Plasmodium gallinaceum* parasite de la poule domestique. Transmission de ce germe par *Stegomyia fasciata* et *Stegomyia albopicta*. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 14: 597-620.
- Brumpt, E. (1936b) Récéptivité de divers oiseaux domestiques et sauvages au parasite (*Plasmodium gallinaceum*) du paludisme de la poule domestique. Transmission de cet hématozoaire par le moustique *Stegomyia fasciata*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 203: 750-752.
- Buffet, P.A., Safeukui, I., Deplaine, G., Brousse, V., Prendki, V., Thellier, M., Turner, G.D., Mercereau-Puijalon, O. (2011) The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*, 117: 381-392.
- Buffet, P.A., Safeukui, I., Milon, G., Mercereau-Puijalon, O., David, P.H. (2009) Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. *Current Opinion in Hematology*, 16: 157-164.
- Buldol, W.S., Carneiro, M., Cardoso, A.C., Alecrim, W.D., Albuquerque, B.C., Alecrim, M.G., Dourado, H.V. (1982) Acute kidney failure in malária due to *Plasmodium falciparum*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 24: sup. 6, 58-61.
- Butler, N.S., Moebius, J., Pewe, L.L., Traore, B., Doumbo, O.K., Tygrett, L.T., Waldschmidt, T.J., Crompton, P.D., Harty, J.T. (2012) Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clear established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nature Immunology* 13:188–195.
- Cabrales, P., Zanini, G.M., Meays, D., Frangos, J.A., Carvalho, L.J. (2010) Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction, and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *American Journal of Pathology* 176: 1306–1315.
- Capitelli, R., Crosta, L. (2013) Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 16: 71–120.
- Carlson, H.C., Allen, J.R. (1969) The acute inflammatory reaction in chicken skin: blood cellular response. *Avian Disease* 14: 817-833.
- CDC. 2014. Centers for Disease Control and Prevention. www.cdc.gov/malaria/about/biology/
- Chapman, L.M., Aggrey, A.A., Field, D.J., Srivastava, K., Ture, S., Yui, K., Topham, D.J., Baldwin, W.M., Morrell, C.N. (2012) Platelets present antigen in the context of MHC class I. *Journal of Immunology* 189: 916–923.
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Simpson, J.A., Newton, P.P., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S., White, N.J. (2000) Parasite multiplication potential and the severity of falciparum malaria. *The Journal of Infectious Diseases* 181: 1206–1209.
- Chuammitri, P., Ostojic, J., Andreasen, C.B., Redmond, S.B., Lamont, S.J., Palic, D. (2009) Chicken heterophil extracellular traps (HETs): Novel defense mechanism of chicken heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 129: 126–131.
- Chukwuocha, U.M., Eke, K.N. (2011) Malaria parasite status and cholesterol level of malaria patients in parts of the IMO River Basin of Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4: 993-996.

- Clark, I.A., Budd, A.C., Aleva, L.M., Cowden, W.B. (2006) Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal* 5: 85.
- Clark, I.A., Cowden, W.B. (1999) Why is the pathology of falciparum worse than that of vivax malaria? *Parasitology Today* 15: 458–461.
- Clark, I.A., Rockett, K.A. (1994) The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitology Today* 10: 410–412.
- Coitel, N., Combes, V., Wassmer, S.C., Chimini, G., Grau, G.E. (2006) Cell vesiculation and immunopathology: implications in cerebral malaria. *Microbes and infection*, 8: 2305-2316.
- Collins, W.E., Jeffery, G.M., Roberts, J.M. (2003) A retrospective examination of anemia during infection of humans with *Plasmodium vivax*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68: 410–412.
- Couper, K.N., Barnes, T., Hafalla, J.C.R., Combes, V., Ryffel, B., Secher, T., Grau, G.E., Riley, E.M., Souza, J.B. (2010) Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *Plos Pathogens* 6: e1000744.
- Cowman, A.F., Berry, D., Baum, J. (2012) The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *Journal of Cell Biology*, 198: 961-971.
- Cui, L., Trongnipatt, N., Sattabongkot, J., Udomsangpetch, R. (2009) Culture of exoerythrocytic stages of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Methods in Molecular Biology* 470: 263-273.
- D'Aloia, M.A., Samour, J., Howlett, J., Bailey, T.A., Naldo, J. (1994) Haemopathologic responses to chronic inflammation in the houbara bustard (*Chlamydotis undulata macqueenii*). *Comparative Haematology International* 4: 203–206.
- Dale, D.C., Wolff, S.M. (1973) Studeos of neutropenia of acute malaria. *Blood* 41: 197-206.
- DaMatta, R.A., Manhães, L., Lassounskaia, E., De Souza, W. (1999) Chicken thrombocytes in culture: lymphocyte-conditioned medium delays apoptosis. *Tissue and Cell* 31: 255–263.
- Daneshwar, C., Davis, T.M.E., Cox-Singh, J., Rafáee, M.Z., Zakaria, S.K., Divis, P.C.S., Singh, B. (2009) Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clinical Infectious Disease* 49: 852–860.
- Day, N.P., Hien, T.T., Schollaardt, T., Loc, P.P., Chuong, L.V., Chau, T.T., Mai, N.T., Phu, N.H., Sinh, D.X., White, N.J., Ho, M. (1999) The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *Journal of Infectious Disease* 180: 1288-1297.
- de Mast, Q., de Groot, P.G., van Heerde, W.L., Roestenberg, M., van Velzen, J.F., Verbruggen, B., Roest, M., McCall, M., Nieman, A.E., Westendorp, J., Syafruddin, D., Fijnheer, R., van Dongen-Lases, E.C., Sauerwein, R.W., van der Ven, A.J. (2010) Thrombocytopenia in early malaria is associated with GP1b shedding in absence of systemic platelet activation and consumptive coagulopathy. *British Journal of Haematology* 151: 495–503, 2010.
- De Souza, K., Silva, M.S., Tavira, L.T. (2008) Variation of nitric oxide levels in imported *Plasmodium falciparum* malária episodes. *African Journal of Biotechnology* 7: 799.
- Dein, F.J. (1986) *Hematology*. in: clinical avian medicine, Philadelphia, W B Saunders, p.174-191.

- Dey, S., Bindu, S., Goyal, M., Pal, C., Alam, A., Iqbal, M.S., Kumar, R., Sarkar, S., Bandyopadhyay, U. (2012) Impact of intravascular hemolysis in malaria on liver dysfunction: involvement of hepatic free heme overload, NF- κ B activation, and neutrophil infiltration. *Journal of Biological Chemistry* 287: 26630-26646.
- Dondorp, A.M., Ince, C., Charunwatthana, P., Hanson, J., van Kuijen, A., Faiz, M.A., Rahman, M.R., Hasan, M., Bin, Yunus, E., Ghose, A., Ruangveerayut, R., Limmathurotsakul, D., Mathura, K., White, N.J., Day, N.P. (2008) Direct *in vivo* assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. *The Journal of Infectious Diseases* 197: 79–84.
- Dubin, I.N. (1954) Growth of exoerythrocytic forms of *Plasmodium gallinaceum* in epithelial cells in tissue culture. *Experimental Parasitology* 3: 425–432.
- Ekvall, H., Arese, P., Turrini, F., Ayi, K., Mannu, F., Premji, Z., Bjorkman, A. (2001) Acute haemolysis in childhood falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 611-617.
- Erf, G.F. (2004) Cell-mediated immunity in poultry. *Poultry Science* 83: 580-590.
- Francischetti, I.M.B., Seydel, K.B., Monteiro, R.Q., Whitten, R.O., Erexson, C.R., Noronha, A.L.L., Osters, G.R., Kamiza, S.B., Molyneux, M.E., Ward, J.M., Talyor, T.E. (2007) *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce tissue factor expression in endothelial cells and support the assembly of multimolecular coagulation complexes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5: 155–165.
- Francischetti, I.M.B., Seydel, K.B., Monteiro, R.Q. (2008) Blood coagulation, inflammation and malaria. *Microcirculation* 15: 81–107.
- França, T.C.C., Santos, M.G., Figueroa-Villar, J.D. (2008) Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. *Química Nova* 31: 1271-1278.
- Frevert, U., Späth, G.F., Yee, H. (2008) Exoerythrocytic development of *Plasmodium gallinaceum* in the white leghorn chicken. *International Journal for Parasitology* 38: 655–672.
- Garba, I.H., Ubom, G.A. (2005) Total serum lactate dehydrogenase activity in acute *Plasmodium falciparum* malaria infection. *Singapore Medical Journal* 46: 632.
- Garnham, P.C.C. (1966) *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Blackwell, Oxford, England; Davis, Philadelphia, 1132p.
- Gavrilescu, L., Denkers, E.Y. (2003) Apoptosis and the Balance of Homeostatic and Pathologic Responses to Protozoan Infection. *Infection and Immunity* 71: 6109-6115.
- Ghigo, D., Todde, R., Ginsburg, H., Constamagna, C., Gautret, P., Bussolino, F., Ulliers, D., Giribaldi, G., Deharo, E., Gabrielli, G., Pescarmona, G., Bosia, A. (1995) Erythrocyte stages of *Plasmodium falciparum* exhibit a high nitric oxide synthase (NOS) activity and release a NOS-inducing soluble factor. *Journal of Experimental Medicine* 182: 677-688.
- Ghosh, K., Shetty, S. (2008) Blood coagulation in falciparum malaria—a review. *Parasitology Research* 102: 571–576.
- Giribaldi, G., Valente, E., Khadjavi, A., Polimeni, M., Prato, M. (2011) Macrophage inflammatory protein-1 α mediates matrix metalloproteinase-9 enhancement in human adherent monocytes fed with malarial pigment. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4: 925-930.
- Goebel, T.W.F., Kaspers, B., Stangassinger, M. (2001) NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *International Immunology* 13: 757-762.

- Goldie, P., Roth Jr, E.F., Oppenheim, J., Vanderberg, J.P. (1990) Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* haemozoin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43: 584–596.
- Gombos, R.B., Hemmings, D.G. (2010) Differential effects on nitric oxide-mediated vasodilation in mesenteric and uterine arteries from cytomegalovirus - Infected mice. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 299: 1124-1134.
- Grecchi, R., Saliba, A.M., Mariano, M. (1980) Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mono-nuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. *Journal of Pathology* 130: 23–31.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982) Analyses of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrite in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126: 131-138.
- Greenberg, J., Trembley, H.L., Coatney, G.R. (1950) Effects of drugs on *Plasmodium gallinaceum* infections produced by decreasing concentrations of a sporozoite inoculum. *American Journal of Hygiene* 51: 194–199.
- Guha, M., Kumar, S., Choubey, V., Maity, P., Bandyopadhyay, U. (2006) Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. *FASEB Journal*, 20, 1224-1226, 2006.
- Haldar, K., Mohandas, N. (2009) Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *American Society of Hematology Education Program*, 2009: 87-93.
- Hansen, D.S. (2012) Inflammatory responses associated with the induction of cerebral malaria: Lessons from experimental murine models. *PLoS Pathogens* 8, e1003045.
- Harmon, B.G. (1998). Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science* 77: 972–977.
- Hooda, A.K., Varma, P.P., Dutta, V. (2007) Fatal cardiac tamponade in malarial acute renal failure. *Ren Failure* 29: 371-373.
- Horn, P., Cortese-Krott, M.M., Keymel, S., Kumara, I., Burghoff, S., Schrader, J., Kelm, M., Kleinbongard, P. (2011) Nitric oxide influences red blood cell velocity independently of changes in the vascular tone. *Free Radical Research* 45: 653-661.
- Huchzermeyer, F.W. (1993) Pathogenicity and chemotherapy of *Plasmodium duare* in experimentally infected domestic turkeys. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 60: 103–110.
- Huff, C.G., Coulston, F. (1944) The development of *Plasmodium gallinaceum* from sporozoite to erythrocytic trophozoite. *Journal of Infectious Disease* 75: 231–249.
- Huff, C.G. (1957) Organ and tissue distribution of the exoerythrocytic stages of various avian malarial parasites. *Experimental Parasitology* 6: 143-162.
- Hunt, N.H., Golenser, J., Chang-Ling, T., Parekh, S., Rae, C., Potter, S., Medana, I.M., Miu, J., Ball, H.J. (2006) Immunopathogenesis of cerebral malaria. *International Journal for Parasitology* 36: 569–582.
- Hunt, N.H., Golenser, J., Chan-Ling, T., Parekh, S., Rae, C., Potter, S., Medana, I.M., Miu, J., Ball, H.J. (2006) Immunopathogenesis of cerebral malaria. *International Journal for Parasitology* 36: 569–582.
- Hussain, I., Qureshi, M.A., McCormick, C.C. (1996) Kinetics of nitrite production and iNOS mRNA expression by chicken macrophages. *Poultry Science* 75: sup. 1:7.
- Idro, R., Ndiritu, M., Ogutu, B., Mithwani, S., Maitland, K., Berkley, J., Crawley, J., Fegan, G., Bauni, E., Peshu, N., Marsh, K., Neville, B., Newton, C. (2007) Burden, features, and outcome of neurological involvement in acute falciparum

- malaria in Kenyan children. *The Journal of the American Medical Association* 297: 2232–2240.
- Jadhav, U.M., Singhvi, R., Shah, R. (2003) Prognostic implications of white cell differential count and white cell morphology in malaria. *Journal of Postgraduate Medicine* 49: 218–220.
- Jakeman, G.N., Saul, A., Hogarth, W.L., Collins, W.E. (1999) Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology* 119: 127-133.
- Jaramillo, M., Plante, I., Ouellet, N., Vandal, K., Tessier, P.A., Olivier, M. (2004) Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection. *Journal of Immunology* 172: 3101-3110.
- Juhl, J., Permin, A. (2002) The effect of *Plasmodium gallinaceum* on a challenge infection with *Ascaridia galli* in chickens. *Veterinary Parasitology* 105: 11-19.
- Kai, O.K., Roberts, D.J. (2008) The pathophysiology of malarial anaemia: where have all the red cells gone? *BMC Medicine* 6: 24.
- Kemp, K., Akanmori, B.D., Adabayeri, V., Goka, B.Q., Kurtzhals, J.A., Behr, C., Hviid, L. (2002) Cytokine production and apoptosis among T cells from patients under treatment for *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical & Experimental Immunology* 127: 151–157.
- Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Matsuura, T., Kasper, H. (1997) A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 13955-13960.
- Kim, I.J., You, S.K., Kim, H., Yeh, H.Y., Sharma, J.M. (2000) Characteristics of Bursal T Lymphocytes Induced by Infectious Bursal Disease Virus. *Journal of Virology* 19: 8884-8892.
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaaranta, H., Moilanen, E. (2005) Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* 4: 471-479.
- Kumar, S., Bandyopadhyay, U. (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters*: 157, 175–188.
- Kurtzhals, J.A.L., Reimert, C.M., Tetter, E., Dunyo, S.K., Koram, K.A., Akanmori, B.D., Nkrumah, F.K., Hviid, L. (1998) Increased eosinophil activity in acute *Plasmodium falciparum* infection - association with cerebral malaria. *Clinical and Experimental Immunology* 112: 303–307.
- Ladhani, S., Lowe, B., Cole, A.O., Kowuondo, K., Newton, C.R. (2002) Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. *British Journal of Haematology* 119: 839-847.
- Latimer, K.S, Bienzle, D. (2000) *Determination and Interpretation of the Avian Leukogram*. In: Feldiman BF, Zinkl JG, Jain NC. Schalm's Veterinary Hematology, 5th ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, p. 417-432.
- Latimer, K.S., Tang, K.N., Goodwin, M.A., Steffens, W.L., Brown, J. (1988) Leukocyte changes associated with acute inflammation in chickens. *Avian Disease* 32:760–772.
- Leclerc, M.C., Durand, P., Gauthier, C., Patot, S., Billotte, N., Menegon, M., Severini, C., Ayala, F.J., Renaud, F. (2004) Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 101: 14455–14460.

- Leclerc, M.C., Hugot, J.P., Durand, P., Renaud, F (2004). Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistics analysis. *Parasitology* 129: 677–684
- Lee, W.C., Cin, P.W., Lau, Y.L., Chin, L.C., Fong, M.Y., Yap, C.J. (2013) Supramaniam RR, Mahmud R. Hyperparasitaemic human *Plasmodium knowlesi* infection with atypical morphology in peninsular Malaysia. *Malaria Journal* 12: 88.
- Leighton, F.A. (1985) Morphological lesions in red blood cells from herring gulls and Atlantic puffins ingesting Prudhoe Bay crude oil. *Veterinary Pathology* 22: 393–402.
- Leng, L., Metz, C.N., Fang, Y., Xu, J. (2003) Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *Journal of Experimental Medicine* 197: 1467–1476.
- Lima-JR, J.C., Rodrigues-da-Silva, R.N., Pereira, V.A., Storer, F.L., Perce-da-Silva, D.S., Fabrino, D.L., Santos, F., Banic, D.M., Oliveira-Ferreira, J.O. (2012) Cells and mediators of inflammation (C-reactive protein, nitric oxide, platelets and neutrophils) in the acute and convalescent phases of uncomplicated *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107: 1035-1041.
- Loiseau, C., Zoorob, R., Robert, A., Chastel, O., Juliard, R., Sorci, G. (2011) *Plasmodium relictum* infection and MHC diversity in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 1264–1272.
- Lopera-Mesa, T.M., Mita-Mendoza, N.K., Van de Hoef, D.L., Dombia, S., Konate, D., Ddoubouya, M., Gu, W., Traore, K., Diakite, S.A.S., Remaley, A.T., Anderson, J.M., Rodriguez, A., Fay, M.P., Long, C.A., Diakite, M., Fairhurst, R.M. (2012) Plasma uric acid levels correlate with inflammation and disease severity in malian children with *Plasmodium falciparum* Malaria. *Plos One* 7: e46424.
- Lumeij, J., Overduin, L. (1990) Plasma chemistry reference values in psittaciformes. *Avian Pathology* 19: 235-244.
- Lumeij, J., Remple, C. (1991) Plasma urea, creatinine and uric acid concentrations in relation to feeding in peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Avian Pathology* 20: 79-83.
- Lundie, R.J., Koning-Ward, T.F., Davey, G.M., Nie, C.Q., Hanse, D.S., Lau, S.L., Mintern, J.D., Belz, G.T., Schofield, L., Carbone, F.R., Villadangos, J.A., Crabb, B.S., Heath, W.R. (2008) Blood-stage *Plasmodium* infection induces CD8⁺ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8 α ⁺ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 105: 14509–14514.
- Macchi, B.M., Quaresma, J.A.S., Herculano, A.M., Crespo-López, M.E., DaMatta, R.A., Nascimento, J.L.M. (2010) Pathogenic action of *Plasmodium gallinaceum* in chickens: Brain histology and nitric oxide production by blood monocyte-derived macrophages. *Veterinary Parasitology* 172: 16–22.
- Machado Siqueira, A., Lopes Magalhães, B.M., Cardoso Melo, G., Ferrer, M., Castillo, P., Martin-Jaular, L., Fernandez-Becerra, C., Ordi, J., Martinez, A., Lacerta, M.V.G., del Portillo, H.A. (2012) Spleen Rupture in a case of untreated *Plasmodium vivax* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1934.
- Mackintosh, C.L., Beeson, J.G. (2004) Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in Parasitology* 20: 597-603.

- Maneerat, Y., Viriyavejakul, P., Punpoowong, B., Jones, M., Wilairatana, P., Pongponratn, E., Turner, G.D., Udomsangpetch, R. (2000) Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. *Histopathology* 37: 269-277.
- Manning, L., Rosanas-Urgell, A., Laman, M., Edone, H., McLean, C., Mueller, I., Siba, P., Davis, T.M.E. (2012) A histopathologic study of fatal paediatric cerebral malaria caused by mixed *Plasmodium falciparum/Plasmodium vivax* infections. *Malaria Journal* 11: 107.
- Martinho, F. (2012) Blood transfusion in birds. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária* 5: 21-30.
- Matsumoto, J., Kawai, S., Terao, K., Kirinoki, M., Yasutomi, Y., Aikawa, M., Matsuda, H. (2000) Malaria infection induces rapid elevation of the soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of *Macaca* monkeys to *Plasmodium coatneyi* infection. *Infection and Immunity* 68: 1183-1188.
- Maurer, M., von Stebut, E. (2004) Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biology* 36: 1882-1886.
- McCutchan, T.F., Kissinger, J.C., Touray, M.G., Rogers, M.J., Li, J., Sullivan, M., Braga, E.M., Krettli, A.U., Miller, L.H. (1996) Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: biological and phylogenetic implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11889–11894.
- McKenzie, F.E., Prudhomme, W.A., Magill, A.J., Forney, J.R., Permpnich, B., Lucas, C., Gasser Jr, R.A., Wongsrichanalai, C. (2005) White blood cell counts and malaria. *Journal of Infectious Disease* 15: 323–330.
- McMorran, B.J., Marshall, V.M., de Graaf, C., Drysdale, K.E., Shabbar, M., Smyth, G.K., Corbin, J.E., Alexander, W.S., Foote, S.J. (2009) Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science* 323: 797–800.
- McQueen, P., McKenzie, F. (2008) Host control of malaria infections: constraints on immune and erythropoietic response kinetics. *PLoS Computational Biology* 4: e100149.
- Mendis, K.N., Carter, R. (1995) Clinical diseases and pathogenesis in malaria. *Parasitology Today* 11: 1-16.
- Messmer, U.K., Pflerschifter, J. (2000) New insights into the mechanisms for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* 22: 878-881.
- Metzger, W.G., Mordmuller, B.G., Kremsner, P.G. (1995) Malaria pigment in leucocytes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89: 637–638.
- Miller, L.H., Ackerman, H.C., Su, X.Z., Wellems, T.E. (2013) Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Medicine* 19: 156-167.
- Miller, L.H., Baruch, D., Marsh, K., Doumbo, O.K. (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673-679.
- Milner, D.A., Valim, C., Carr, R.A., Chandak, P.B., Fosiko, N.G., Whitten, R., Playforth, K.B., Seydel, K.B., Kamiza, S., Molyneux, M.E., Taylor, T.E. (2013) A histological method for quantifying *Plasmodium falciparum* in the brain in fatal paediatric cerebral malaria. *Malaria Journal* 12:191.

- Minias, P., Kaczmarek, K., Janiszewski, T., Markowski, J. (2013) Hematology and plasma biochemistry values of great cormorant (*Phalacrocorax carbo sinensis*) nestlings. *Journal of Wildlife Diseases* 49: 194–196.
- Mitchell, E.B., Johns, J. (2008) Avian haematology and associated disorders. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 11: 501-522.
- Mohapatra, S., Samantaray, J.C., Arulsevi, S., Ghosh, A. (2013) Disseminated intravascular coagulation following malaria due to *Plasmodium vivax*: a thromboelastography-based study. *Malaria Journal* 12: 336.
- Montali, R.J. (1988) Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of Comparative Pathology* 99:1–26.
- Nagao, E., Arie, T., Dorward, D.W., Fairhurst, R.M., Dvorak, J.A. (2008) The avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* causes marked structural changes on the surface of its host erythrocyte. *Journal of Structural Biology*, 162, 460- 467.
- Naotunne, T., Karunaweera, N., Mendis, K., Carter, R. (1993) Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates. *Immunology* 78: 555–562.
- Nazifi, S., Rrazavi, S.M., Yavari, F., Rajaifar, M., Bazyar, E., Esmailnejad, Z. (2008) Evaluation of hematological values in indigenous chickens infected with *Plasmodium gallinaceum* and *Aegyptianella pullorum*. *Comparative Clinical Pathology* 17: 145-148.
- Newton, C.R., Warn, P.A., Winstanley, P.A., Peshu, N., Snow, R.W., Pasvol, G., Marsh K. (1997) Severe anaemia in children living in a malaria endemic area of Kenya. *Tropical Med and International Health* 2: 165-178.
- NIAID – National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Malária. 2012. <http://www.niaid.nih.gov/topics/malaria/pages/lifecycle.aspx>
- Nishimoto, Y., Arisue, N., Kawai, S., Escalante, A.A., Horii, T., Tanabe, K., Hashimoto, T. (2008) Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47, 45-53, 2008.
- Organização Mundial da Saúde. Fact sheet n° 94. 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>. 2013
- Palinauskas, V., Valkiunas, G., Bolshkov, C.V., Bensch, S. (2008) *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 120: 372–380.
- Paraense, W.L. (1945) A transmissão de *Plasmodium gallinaceum* pelo *Aedes (Ochlerotatus) lepidus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 42: 81-84.
- Paraense, W.L. (1946) Ações patogênicas das formas exo-eritrocitárias do *Plasmodium gallinaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 44: 147–191.
- Paraense, W.L. (1948) A latência parasitêmica na infecção do *Gallus gallus* pelo *Plasmodium lophurae*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 46: 73-87.
- Patwari, A., Aneja, S., Berry, A.M., Ghosh, S. (1979) Hepatic dysfunction in childhood malaria. *Archives of Disease in Childhood* 54: 139-141.
- Paulman, A., McAllister, M.M. (2005) *Plasmodium gallinaceum*: clinical progression, recovery and resistance to disease in chickens infected via mosquito bite. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73: 1104–1107.
- Pekny, M., Nilsson, M. (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427-434.

- Percario, S., Moreira, D.R., Gomes, B.A.Q., Ferreira, M.E.S., Gonçalves, A.C.M., Laurindo, P.S.O.C., Vilhena, T.C., Dolabela, M.F., Green, M.D. (2012) Oxidative stress in malária. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 16346-16372.
- Permin, A., Juhl, J. (2002) The development of *Plasmodium gallinaceum* infections in chickens following single infections with three different dose levels. *Veterinary Parasitology* 105: 1-10.
- Picot, S. (2006) Is *P. vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria? *Médecine et Maladies Infectieuses* 36: 406-413.
- Plassmeyer, M.L., Reiter, K., Shimp Jr, R.L., Kotova, S., Smith, P.D., Hurt, D.E., House, B., Zou, X., Zhang, Y., Hickman, M., Uchime, O., Herrera, R., Nguyen, V., Glen, J., Lebowitz, J., Jin, A.J., Miller, L.H., MacDonald, N.J., Wu, Y., Narum, K.L. (2009) Structure of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. *Journal of Biological Chemistry* 284, 26951-26963.
- Potter, S., Ling-Chang, T., Ball, H.J., Mansours, H., Mitchell, A., Maluish, L., Hunt, N.H. (2006) Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *International Journal for Parasitology* 36: 485–496.
- Pradhan, P. (2009) Malarial anaemia and nitric oxide induced megaloblastic anaemia: a review on the causes of malarial anaemia. *Journal of Vector Borne Disease* 46: 100-108.
- Prato, M., Gallo, V., Giribaldi, G., Aldieri, E., Arese, P. (2010) Role of the NF- κ B transcription pathway in the haemozoin- and 15-HETE-mediated activation of matrix metalloproteinase-9 in human adherent monocytes. *Cellular Microbiology* 12: 1780-1791.
- Ramos-Jr, W.M., Sardinhal, J.F.J., Costal, M.R.F., Santana, M.S., Alecrim, M.G.C., Lacerda, M.V.G. (2010) Clinical aspects of hemolysis in patients with *P. vivax* malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 14: 410-412.
- Rasheed, A., Saeed, S., Khan, S.A. (2009) Clinical and laboratory findings in acute malaria caused by various *Plasmodium* species. *Journal of Pakistan Medical Association* 59: 220-223.
- Rodriguez-Morales, A.J., Sanchez, E., Arria, M., Vargas, M., Piccolo, C., Colina, R., Franco-Paredes, C. (2005) White blood cell counts in *Plasmodium vivax* malaria. *The Journal of Infectious Diseases* 192: 1675–1676.
- Rosemberg, R., Koontz, L.C. (1984) *Plasmodium gallinaceum*: Density Dependent Limits on Infectivity to *Aedes aegypti*. *Experimental Parasitology* 57: 234-238.
- Roy, S.W., Irimia, M. (2008) Origins of Human Malaria: Rare Genomic Changes and Full Mitochondrial Genomes Confirm the Relationship of *Plasmodium falciparum* to other mammalian parasites but complicate the origins of *Plasmodium vivax*. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1192-1198.
- Rupley, A.E. (1999) *Patologia Clínica*. In: Manual de Clínica Aviária. São Paulo: Editora Roca, 369-430.
- Sahu, P.K., Pal, A., Panda, J., Patnaik, S. (2011) Diuretics induced uremia and nonrecovery of renal function in a patient with acute renal failure caused by sepsis. *Indian Journal of Pharmacology* 43: 603–604.
- Salmon, B.L., Oksman, A., Goldberg, D.E. (2001) Malaria parasite exit from the host erythrocyte: s two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 271-276.

- Schofield, L., Grau GE. (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Reviews Immunology* 5: 722–735.
- Schwarzer, E., Alessio, M., Ulliers, D., Arese, P. (1998) Phagocytosis of the malarial pigment, haemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. *Infection and Immunity* 66: 1601–1606.
- Schmidt, E.M.S., Paulillo, A.C., Alfaro, D.M., Oliveira, E.G., Mangrich-Rocha, R.M.V., Santin, E. (2006) Parâmetros laboratoriais de frangos de corte vacinados contra a coccidiose. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* suplemento 8: 207.
- Seed, T.M., Manwell, R.D. (1977). *Plasmodia of birds*. In J.P. Kreier (Ed.), *Parasitic Protozoa*, Vol. III, 1st edn (pp. 311-357). London: Academic Press.
- Segal, A. (2005) How neutrophils kill microbes? *Annual Review of Immunology* 23: 197–223.
- Shahabuddin, M., Kaidoh, T., Aikawa, M., Kaslow, D.C. (1995) *Plasmodium gallinaceum*: mosquito peritrophic matrix and the parasite-vector compatibility. *Experimental Parasitology* 81: 386-393.
- Sharma, A., Eapen, A., Subbarao, S.K. (2004) Parasite killing in *Plasmodium vivax* malaria by nitric oxide: implication of aspartic protease inhibition. *Journal of Biochemistry* 136: 329-334.
- Shi-Ichi, I., Niikura, M., Mineo, S., Kobayashi, F. (2013) Roles of IFN-g and $\gamma\delta$ T cells in protective immunity against blood-stage malária. *Frontiers in Immunology* 4: 1-9.
- Shio, M.T., Kassa, F.A., Bellemare, M.J., Oliver, M. (2010) Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes and Infection* 12: 889-899.
- Silveira, P., DaMatta, R.A., Dagosto, M. (2009) Hematological changes of chickens experimentally infected with *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare*. *Veterinary Parasitology* 162: 257–262.
- Silveira, P., Marin, S.Y.G., Moreira, P.A., Tocantins, B.B., Lacorte, G., Paixão, T.A., Martins, N.R.S., Braga, E. (2013) Interactions of *Plasmodium juxtannucleare* and chicken anaemia virus: establishing a model. *Parasitology* 140: 1777–1788.
- Singh, B., Kim Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S., Cox-Singh, J., Thomas, A., Conway, D.J. (2004) A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363: 1017–1024.
- Singh, D., Gupta, V., Acharya, S., Mahajan, S.N., Verma, A. (2012) A case of *Plasmodium vivax* malaria associated with severe autoimmune hemolytic anaemia. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 5: 133-136.
- Singh, S., Alam, M.M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J.A., Chitnis, C.E. (2010) Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS Pathogens* 6: e1000746.
- Slater, L.B. (2005) Malarial birds: modeling infectious human disease in animals. *Bulletin of the History of Medicine* 79: 261–294.
- Sobolewski, P., Gramaglia, I., Frangos, J., Intaglietta, M., van der Heyde, H.C. (2005) Nitric oxide bioavailability in malaria. *Trends in Parasitology* 21: 415-422.
- Sun, T., Holowka, T., Song, Y., Zierow, S., Leng, L., Chen, Y., Xiong, H., Griffith, J., Nouraie, M., Thuma, P.E., Lolis, E., Janse, C.J., Gordeuk, V.R., Augustijn, K., Bucala, R. (2012) A Plasmodium-encoded cytokine suppresses T-cell immunity during malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 2117–2126.
- Swann, A.I. (1973) *Plasmodium gallinaceum*: Mechanisms of anemia in infected chickens. *Experimental Parasitology* 33: 79-88.

- Tadjalli, M., Saeed, N., Behrokh, M.A., Majidi, B. (2013) Histomorphometric study on blood cells in male adult ostrich. *Veterinary Research Forum* 4: 199 – 203.
- Taliaferro, W.H., Taliaferro, L.G. (1955) Reactions of the connective tissue in chickens to *Plasmodium gallinaceum* and *Plasmodium lophurae*. I. Histopathology during initial infections and superinfections. *Journal of Infectious Diseases* 97: 99-136.
- Taramelli, D., Basilico, N., Pagani, E., Grande, R., Monti, D., Ghione, M., Olliaro, P. (1995) The heme moiety of malaria pigment (beta-hematin) mediates the inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by lipopolysaccharidestimulated macrophages. *Experimental Parasitology* 81: 501–511.
- Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A., Weiser, G. (2007) *Hematologia e Bioquímica Veterinária*. 1. Ed. Rocca: São Paulo. 582p.
- Tolosano, E., Fagoonee, S., Hirsch, E., Berger, F.G., Baumann, H., Silengo, L., Altruda, F. (2002) Enhanced splenomegaly and severe liver inflammation in haptoglobin / hemopexin double-null mice after acute hemolysis. *Blood* 100: 4201–4208.
- Topp, R.C., Carlson, H.C (1972). Studies on avian heterophils. III. *Avian Disease* 16: 374-380.
- Urban, B., Hien, T.T., Day, N.P., Phu, N.H., Roberts, R., Pongponratn, E., Jones, M., Mai, N.T.H., Bethell, D., Turner, G.D.H., Ferguson, D., White, N.J., Roberts, D.J. (2005) Fatal *Plasmodium falciparum* malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization. *Infection and Immunity* 73: 1986–1994.
- Valkiunas, G. (2005) *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press: Boca Raton, Flórida. 946p.
- Van der Heiden, N. (1994) Evaluation and interpretation of the avian hemogram. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 3: 5–13.
- Van de Vyver, A., Delpont, E.F., Esterhuizen, M., Pool, R. (2010) The correlation between C-reactive protein and toxic granulation of neutrophils in the peripheral blood. *The South African Medical Journal* 100: 442-444.
- van der Heyde, H.C., Nolan, J., Combes, V., Gramaglia, I., Grau, G.E. (2006) A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends in Parasitology* 22; 503–508.
- Vashist, U., Falqueto, A.D., Lustrino, D., Tunholi, V.M., Tunholi-Alves, V.M., Dos Santos, M.A.J., D'Agosto, M., Massard, C.L., Pinheiro, J. (2011) Hepatic profile of *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758) experimentally infected by *Plasmodium juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941). *Veterinary Parasitology* 175: 207–211.
- Villegas-Mendez, A., Greig, R., Shaw, T.N., de Souza, J.B., Gwyer Findlay, E., Stumhofer, J.S., Hafalla, J.C., Blount, D.G., Hunter, C.A., Riley, E.M., Couper, K.N. (2012) IFN- γ -producing CD4⁺ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8⁺ T cell accumulation within the brain. *Journal of Immunology* 189: 968-979.
- Vincke, I.H., Lips, M. (1948) Un nouveau plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo, *Plasmodium berghei* n. sp. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale* 28: 97–104.
- White, J.G. (2005) Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. *Platelets* 16: 121-131.

- White, N.J. (1996) *Malaria*. In: Manson's Tropical Diseases, WB Saunders Company, Londres, p. 1087-1170.
- Wideman, R.F., Bowen, O.T., Erf, G.F., Chapman, M.E. (2006) Influence of aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on the pulmonary hypertensive response to microparticle injections in broilers. *Poultry Science* 85: 511–527.
- Wiedling, S. (1941) *Culex quinquefasciatus*, a new vector of *Plasmodium gallinaceum*. *Science* 94: 389-390.
- Williams, R.B. (2005) Avian malaria: clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*. *Avian Pathology* 34: 29–47.
- Wright, R.H., Kreier, J.P. (1969) *Plasmodium gallinaceum*: chicken erythrocyte survival as determined by sodium radiochromate 51 and diisopropylfluorophosphate 32 labeling. *Experimental Parasitology* 25: 339–352.
- Yañez, D.M., Batchelder, J., vander Heyde, H.C., Manning, D.D., Weidanz, W.P. (1999) $\gamma\delta$ T-cell function in pathogenesis of cerebral malaria in mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *Infection and Immunity* 67: 446–448.
- Yeo, T.W., Lampah, D.A., Tjitra, E., Gitawati, R., Darcy, C.J., Jones, C., Kenangalem, E., McNeil, Y.R., Granger, D.L., Lopansri, B.K., Weiberg, J.B., Price, R.N., Duffull, S.B., Celermajer, D.S., Anstey, N.M. (2010) Increased asymmetric dimethylarginine in severe falciparum malaria: association with impaired nitric oxide bioavailability and fatal outcome. *PLoS Pathogens* 6: e1000868.
- Zinkl, J.G. (1986) *Avian Hematology*. in: Jain, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. 4th ed, Philadelphia, Lea & Febiger, p.256-273.
- Zuckerman, A., Abzug, S., Burg, R. (1969) Anemia in rats with equivalent splenomegalies induced by methyl cellulose and *Plasmodium berghei*. *Military Medicine* 134: 1084-1099.