

VICTOR HUGO VALENTE CARVALHO

ATUALIZAÇÃO DO PAPEL DA NADPH OXIDASE NA MALÁRIA

BELÉM

2019

VICTOR HUGO VALENTE CARVALHO

ATUALIZAÇÃO DO PAPEL DA NADPH OXIDASE NA MALÁRIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Paula do Socorro de Oliveira da Costa Laurindo, Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo – ICB – UFPA

Coorientador: Prof. Livre-Docente Sandro Percário. Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo – ICB – UFPA

BELÉM

2019

VICTOR HUGO VALENTE CARVALHO

ATUALIZAÇÃO DO PAPEL DA NADPH OXIDASE NA MALÁRIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Paula do Socorro de Oliveira da Costa Laurindo
Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo, UFPA

Coorientador: Prof. Livre-Docente Sandro Percário
Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo, UFPA

Avaliador: Prof. Dr. Danilo Reymão Moreira
Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo, UFPA

Avaliador: Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira
Laboratório de Análises Clínicas, UFPA

BELÉM

2019

EPÍGRAFE

“Se você quer os acertos, esteja preparado para os erros.”

(Carl Yastrzemski)

“Em ciência leia sempre os livros mais novos. Em literatura, os mais velhos.”

(Millôr Fernandes)

DEDICATÓRIA

Ao meu avô Alcino Carvalho (*in memoriam*), por todo o carinho e atenção que teve comigo, e que tenho certeza que estaria muito feliz por essa minha realização.

À minha mãe Lídia Carvalho, por toda ajuda e carinho e para demonstrar que o investimento feito está trazendo mais um bom fruto.

Ao meu irmão Nícolas Carvalho, para servir de um exemplo, de mais uma referência familiar de sucesso no âmbito acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela boa saúde, pela proteção, pela casa que moro, por eu ter pessoas que querem meu bem e por eu ter condição e oportunidades de poder aprimorar-me nos estudos.

Ao meu avô Alcino, por todo o carinho e atenção que teve no pouco tempo em que esteve comigo. Você faz falta.

À minha mãe, por toda a dedicação para que os seus filhos tivessem uma condição de vida melhor do que a qual vivenciou durante a infância e adolescência, pelo carinho, pela atenção e pelos cuidados.

Ao meu irmão Nícolas, pelo companheirismo, pelas risadas, pelo apoio, pelo carinho e pelas oportunidades que tive com a sua presença na minha vida.

À minha “tia” Lygia Bardot, por todo apoio nas horas difíceis, pela dedicação para ensinar a meu irmão e a mim um pouco do que aprendeu durante a vida e pelas oportunidades singulares que você ajudou a proporcionar.

À Profa. Dra. Paula Laurindo por aceitar ser minha orientadora e dispor de tempo e atenção para tornar essa monografia possível.

Ao Prof. Livre-Docente Sandro Percário pela oportunidade de eu poder estagiar no Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo (LAPEO) e conhecer pessoas queridas, esforçadas e estudiosas que contribuíram para um ambiente caloroso, fraternal e familiar que é o LAPEO e por dispor de tempo e atenção para tornar essa monografia possível.

À Dra. Carol, Dra. Paula, Ma. Maria do Céu, Dr. Danilo Moreira e Dr. Edison Abraham pelos ensinamentos sobre equipamentos laboratoriais, biotério, MDA, TEAC e DPPH e pelo breve contato com os bastidores de dissertação/ tese, assim como aos estagiários Jhone, Iane Guimarães, Lângela Carmo, Luan Frade e Amanda Freire pelas experiências que tivemos.

À Daisy, Iury, Wlyana, Luciana, Marco, Silvia, Jéssica, pelas risadas, pelos momentos de conversa pós-aula nos corredores ou arredores do ICB, pelas companhias nas longas filas do R.U. para pegar o almoço e pelos apoios nos estudos de provas e seminários.

Aos meus amigos de colégio Felipe Santos, Raphael Favacho, Bárbara Brabo, Amanda Segtowich, Amanda Avelar, Ana Clara Braga e Dandara Nobre pela parceria, ajuda, carinho e anos de convivência.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS.....	Vi
RESUMO.....	Viii
1 APRESENTAÇÃO.....	1
2 ARTIGO.....	2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
ANEXO.....	20

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1. Distribuição e estrutura dos sete membros da família da NADPH Oxidase ..	11
FIGURA 1. Representação esquemática da atuação das ERO nas vias intrínseca e extrínseca de apoptose, que acontece de várias maneiras, entre elas: A) Oxidação das ligações de dissulfeto entre Trx1 e QSA-1, liberando a QSA-1, que autofosforila, dimeriza e recruta FATR2/6. O novo complexo, por sua vez, ativa QJN, e induz apoptose via mitocôndria ou via transcrição de genes pró-apoptóticos dependentes de PA-1; B) Inativação da proteína inibitória do FasR, que recruta FADD e pró-caspase 8, com posterior ativação de caspase-8; C) Oxidação da cardiolipina, fosfolípido presente na mitocôndria, que favorece a ação da t-bid e facilita a liberação de citocromo-c. No citoplasma, a proteína interage com Fap-1 e caspase-9, resultando na liberação da efetora caspase-3; D) Sustentada ativação da QJN, que causa apoptose dependente da liberação de citocromo-c mitocondrial. TNFR1, ativado após ligação com TNF- α , recruta as proteínas DDART, DDAF e pró-caspase 8, ativando a caspase-8 e induzindo produção intracelular de ERO. A caspase-8 em altas concentrações ativa a caspase-3 independentemente da mitocôndria [11, 16, 36]	12
FIGURA 2. Estrutura da NADPH Oxidase 2 em estado de repouso (A) e de ativação (B)....	13

LISTA DE ABREVIATURAS, SGILAS OU SÍMBOLOS

BCR	Complexo do Receptor de Célula B
BH4	Tetrahidrobiopterina
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
CSP	Proteína Circunsporozoíta
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
DPI	Difenileno-Iodônio
DUOX	Dual Oxidase
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo reduzida
FN- $\kappa\beta$	Fator Nuclear kappa beta
GDP	Guanosina Difosfato
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GTP	Guanosina Trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IMM	Fator de inibição da migração de macrófagos
MAI-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida
NLRP3	Família de Receptores do tipo NOD contendo o domínio Pirina 3
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOX	NADPH Oxidase
NoxA1	NADPH Oxidase Adaptador 1
NoxO1	NADPH Oxidase Organizador 1
O ₂	Oxigênio molecular
PfEMP-1	Proteína de Membrana Eritrocitária-1 do <i>Plasmodium falciparum</i>
PRL-1	Proteína-1 relacionada a Receptor de Lipoproteína de baixa densidade

PSM-1	Proteína-1 de Superfície do Merozoíto
Rho-GDI	Inibidores da Dissociação do Nucleotídeo Guanina Rho-específico
RRP	Região Rica em Prolina
SOD	Superóxido Dismutase
SOD-1	Superóxido Dismutase 1
Syk	Tirosina Quinase Esplênica
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa

RESUMO

A malária, consequência da infecção por espécies pertencentes ao gênero *Plasmodium*, dá-se através do repasto sanguíneo pelo vetor anofelino infectado com esporozoítos. Na eliminação de micro-organismos, especialmente do plasmódio, a produção de radicais livres tem papel importante. Entre as diversas fontes produtoras de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), a família das NADPH Oxidases (NOX) é a única que possui como função primária a formação de radicais livres. Ela está presente em várias linhagens celulares e possui sete isoformas: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, Dual Oxidase 1 e 2 (DUOX1 e DUOX2). Elas desempenham diversas funções, como atividade microbicida, angiogênese e migração de neutrófilos, células endoteliais e musculares lisas. Devido à multifuncionalidade, muitas isoformas estão relacionadas a mecanismos fisiopatogênicos de várias doenças, entre elas aterosclerose e hipertensão. No que diz respeito a participação na malária, estudos com camundongos *knockout* ou com uso de inibidores são realizados para elucidar o papel da NOX no desenvolvimento da doença. Entre os poucos estudos realizados, nenhum demonstrou o papel das NOX no controle da densidade parasitária ou sobre a gravidade da doença. No entanto, destaca-se que a inibição destas enzimas contribuiu para a diminuição da sobrevivência em animais de experimentação. Novas abordagens deverão ser feitas para estabelecer o papel desse complexo enzimático na fisiopatologia da doença, porque o que está definido quanto a importância da enzima é que ela não é essencial para a destruição do plasmódio e que contribui para a sobrevivência do hospedeiro a longo prazo.

Palavras-chave: *Plasmodium* sp.; NOX; Malária; Estresse oxidativo; Apocinina; DPI.

1 APRESENTAÇÃO

A malária é um grave problema de saúde pública por tratar-se de uma das causas de milhares de mortes pelo mundo, portanto, faz-se necessário compreender as reações do hospedeiro aos mecanismos fisiopatológicos e os mecanismos propriamente ditos, a fim de desenvolver métodos mais eficazes de tratamento e de prevenção. No que tange a essas reações, os sintomas e sinais típicos da enfermidade são consequências da resposta imune do hospedeiro a presença do parasito, correlacionada com o ciclo biológico. Entre a ação de citocinas, granulócitos e linfócitos, a produção de radicais livres também contribui para o extermínio do plasmódio. Nesse âmbito, o ser humano dispõe, entre outras fontes, do complexo enzimático NADPH Oxidase, presente em várias linhagens celulares, com destaque para as células do sistema imune. Como a relação desse complexo com o transcurso da doença ainda não foi totalmente esclarecida, esse será o tema abordado neste artigo de revisão. A *Reactive Oxygen Species* (ROS) é uma revista online revisada por pares dedicada à disseminação rápida de novos conhecimentos em oxigênio reativo e espécies/ entidades relacionadas (incluindo antioxidantes) em Química, Biologia e Medicina. Publica bimensalmente em dois volumes ao ano quatro tipos de contribuições: (i) artigos de revisão de especialistas nos campos relacionados; (ii) destaques dos mais recentes resultados de pesquisa de ponta publicados em revistas altamente influentes; (iii) protocolos de métodos de pesquisa; e (iv) contribuições de pesquisa originais, sob o ISSN 2380-2367. Por enfatizar a qualidade em vez de quantidade, todos os manuscritos submetidos à revista passam por um processo de revisão de duas fases: avaliação do Comitê de Revisão Editorial, composta por três especialistas internacionalmente reconhecidos, e avaliação por pares por pelo menos dois especialistas externos. Caso o Comitê julgue um manuscrito como de mérito científico limitado e baixo impacto geral, este não será submetido a segunda etapa de revisão. A eventual aceitação para publicação será baseada principalmente na avaliação dos revisores de pares em conjunto com as recomendações do Comitê de Revisão Editorial da Revista quanto a originalidade, qualidade, impacto potencial e legibilidade do trabalho.

2 ARTIGO

ABSTRACT

Malaria, as a consequence of infection by species belonging to genus *Plasmodium*, occurs through blood meal by the anopheline vector infected with sporozoites. In the elimination of microorganisms, especially the plasmodium, the production of free radicals plays an important role. Among the various sources of Reactive Oxygen Species (ROS), NADPH Oxidases (NOX) family is the only one whose primary function is the production of free radicals. It is present in several cell lines and has seven isoforms: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 and DUOX2. They perform diverse functions such as microbicidal activity, angiogenesis and migration of neutrophils, smooth muscle and endothelial cells. Due to multifunctionality, many isoforms are related to several diseases, among them atherosclerosis and hypertension. Regarding participation in malaria, studies with knockout mice or with the use of inhibitors are performed to elucidate the role of NOX in the development of the disease. Among the few studies performed, none showed a significant difference in the control of the parasite density or on the severity of the disease. Nevertheless, it is noted that inhibition of these enzymes contributes to shorter life span in experimental animals. New approaches should be performed to establish the role of this enzymatic complex on the physiopathology of the disease, as it is not essential for the destruction of the plasmodium, but contributes to the long-term survival of the host.

Keywords: *Plasmodium* sp.; NOX; Malaria; Oxidative stress; Apocynin; DPI.

Introdução

A malária, consequência da infecção por espécies pertencentes ao gênero *Plasmodium*, acompanha a humanidade desde a dispersão do *Homo sapiens* da África para o restante do mundo. Apesar de ter ocorrido em todos os continentes, desde meados do Século XX restringe-se a países na faixa tropical, em decorrência do subdesenvolvimento, do clima favorável para a procriação do vetor, a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, e da precária qualidade de vida que qualifica a miséria desses lugares [10].

A transmissão dá-se através do repasto sanguíneo pelo vetor infectado com esporozoítos da malária, inoculando-os na corrente sanguínea, que irão depois migrar para os hepatócitos, iniciando a primeira fase do ciclo assexuado no hospedeiro intermediário: a

esquizogonia tecidual [13]. Após amadurecimento, as células do fígado são fendidas, liberando uma estrutura vesicular denominada merossoma, que ao romper lança milhares de merozoítos na circulação sanguínea. Nas infecções por *P. vivax* ou *P. ovale*, alguns permanecem no órgão na forma latente, os hipnozoítos [2, 22].

O quadro clínico comum da enfermidade, caracterizado por febre alta intermitente, acompanhada de calafrios e sudorese que sucedem em períodos cíclicos (24h quando *P. knowlesi*, 48h quando *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. ovale*; e 72h quando *P. malariae*), é devido à lise das hemácias infeccionadas pelo plasmódio [2, 42]. Esse processo aumenta o número de merozoítos livres no tecido sanguíneo, que irão infectar outros eritrócitos, o que fundamentalmente caracteriza a segunda fase: a esquizogonia sanguínea [32].

Após algumas gerações, uma pequena parcela dos merozoítos diferenciam-se em gametócitos, que irão desenvolver o ciclo sexuado no vetor após o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado [22].

Inicialmente, os sintomas são semelhantes aos de uma infecção viral, um dos motivos que dificultam um diagnóstico mais preciso. As manifestações clínicas características, assim como a detecção do parasito através de exames, só ocorrem após o início da esquizogonia sanguínea, pois resultam da liberação de metabólitos, como a hemozoína, pela ruptura das hemácias; da subsequente resposta inflamatória - principais responsáveis pelo paroxismo malárico (a tríade febre elevada, calafrios e sudorese durante os períodos característicos); e do consecutivo aumento da população parasitária no sangue, que, juntamente com a fagocitose de eritrócitos não-parasitados pelo baço e pelo fígado, contribuem para a evolução do quadro da anemia [15, 34, 35].

Em infecções por *P. falciparum*, é frequente a progressão da doença para complicações graves, principalmente quando acomete o cérebro (malária cerebral), pulmões ou rins [55]. Isso ocorre porque o parasito prejudica a microcirculação ao alterar a permeabilidade da membrana das células infectantes e inserir proteínas e antígenos específicos (como a proteína de membrana eritrocitária-1 do *P. falciparum* – PfEMP-1), permitindo-as aderirem ao endotélio de pequenos vasos, além de comporem agregados em forma de roseta com células não-infectadas [15, 20].

Além disso, o potencial hiperparasitêmico também favorece a evolução da gravidade da doença, assinalado pelo menor tempo de maturação no fígado, maior número de

merozoítos ao fim da esquizogonia tecidual, capacidade de invadir glóbulos vermelhos de qualquer idade e afinidade com os receptores para glicoforina [20, 42]. Apesar da maior morbidade e mortalidade decorrer de infecções pelo *P. falciparum*, já foram registrados casos graves em infecções por *P. vivax* ou *P. ovale* [32].

Apesar das complicações advindas da infecção e das baixas condições socioeconômicas das pessoas contaminadas, que favorecem o agravamento da doença, felizmente há uma tendência decrescente no número de episódios e na mortalidade ao longo dos anos. No ano de 2016, foi estimado que o número de casos no mundo diminuiu para 216 milhões, uma queda de 18% em comparação ao ano 2000, e o número de mortes decresceu 47% em relação ao mesmo ano, para 445 mil mortes [57, 58]. No Brasil, no ano de 2014 foram descritos cerca de 144 mil casos, uma queda de 76% em relação ao ano 2000, e um decréscimo de 85% no número de óbitos em comparação ao mesmo ano, para 38 mortes [5, 6].

Embora haja redução do número de casos e de óbitos, a enfermidade ainda é problema de saúde pública, em virtude do número de infectados pelo *P. falciparum* ainda ser de grande preocupação, do número maior de cepas dessa espécie resistentes às terapias vigentes, da dificuldade na obtenção de uma vacina eficaz e da pouca compreensão acerca dos mecanismos fisiopatológicos dos agentes etiológicos. Na busca por essa compreensão, serão abordados alguns aspectos, assim como a relação entre a enzima NADPH Oxidase (NOX) e a malária, a fim de identificar em quais eventos na evolução da patologia a ação da enzima está presente.

Resposta imune e malária

Pelo ponto de vista imunológico, as várias formas evolutivas do parasito têm importante papel na formação da resposta imune: ela costuma ser mais acentuada contra os merozoítos do que contra os esporozoítos. Isso ocorre principalmente por conta da baixa imunogenicidade do segundo, do curto tempo de exposição na corrente sanguínea e de mecanismos intrínsecos para evadir do sistema imune [37]. Entre eles, podemos citar o fato de proteínas essenciais para a invasão da célula hospedeira estarem retidas em organelas especializadas, para escapar da ação dos anticorpos [23].

O local inicial da invasão, a pele, costuma apresentar considerável proporção de células T reguladoras ativas, que juntamente com agentes anticoagulantes e imunomoduladores na saliva do mosquito e o baixo número de esporozoítos injetados durante o repasto, dificulta o início de uma resposta inflamatória local eficiente [12, 50].

Após chegarem no fígado em questão de minutos, ultrapassam a barreira sinusoidal transversalmente pelas células de Kupffer. Foi confirmado também que atravessam pelas células endoteliais e, em menor extensão, sem adentrar nenhuma célula [53]. Testes *in vitro* demonstraram que a interação da proteína circunsporozoíta (CSP), do parasito, com a proteína-1 relacionada a receptor de lipoproteína de baixa densidade (PRL-1), expressa nas células de Kupffer, induz uma cascata de sinalização que inibe a explosão respiratória [54].

Baer *et al.* [3] demonstraram que a remoção dessas células em camundongos por injeção de clodronato intensifica a infecção, pois expõe as brechas da barreira sinusoidal, assim, deduz-se que uma porcentagem dos esporozoítos são capturados. Além dos macrófagos residentes, anticorpos inibitórios bloqueiam a migração e invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos, mas para ser efetivos precisam estar em título muito alto. Acredita-se que a atuação mais eficaz venha dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, seja por citólise ou indiretamente através da produção de IFN- γ , que ativa a via do óxido nítrico, letal para o invasor [44].

No interior dos hepatócitos, o parasito expressa paulatinamente proteínas típicas da forma merozoíta em detrimento daquelas da forma esporozoíta, como é o caso da proteína-1 de superfície do merozoíta (PSM-1) ao invés da CSP, que desempenham funções semelhantes quanto a invasão das células-alvos e a respostas do hospedeiro [23].

Posteriormente a transformação, os merozoítos são liberados longe da área hepática, geralmente nos pulmões, devido a ruptura da merossoma [44]. Essa estrutura evita a ação do sistema imune do hospedeiro, em virtude de não estar exposta a fosfatidilserina, fosfolípido presente na membrana celular que induz a fagocitose ao ser reconhecido pelas células de Kupffer [21].

Por invadir células que não expressam CPH classe I e assim não ativar linfócitos T CD8⁺, a resposta imune torna-se mais significativa somente após o início do ciclo eritrocítico, pois a liberação de produtos tóxicos desencadeia a produção de citocinas e a ativação de células do sistema imune. Um exemplo disso são as proteínas de membranas plasmodiais com

“ancoradores” glicosilfosfatidilinositol (GPI), que ativam células dendríticas, macrófagos e linfócitos B de humanos e ratos através do complexo TLR2-TLR1 [31].

O subsequente aumento na produção de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e interleucinas pró-inflamatórias, além de também ativarem a função fagocítica dos macrófagos, estimula a produção de radicais livres de oxigênio, óxido nítrico e outros radicais livres de nitrogênio, os mais atuantes quanto a eliminação do invasor [12, 31].

Radicais Livres e malária

Com o aumento da frequência da ruptura de hemácias pelos merozoítos no transcurso da doença, há um constante estímulo na produção de citocinas inflamatórias, que ocasiona maior geração de radicais livres, acima da capacidade do sistema antioxidante do hospedeiro. Esse desequilíbrio em favor dos radicais livres caracteriza o estresse oxidativo. Embora haja relatos de que a produção de estresse oxidativo seja prejudicial, sabe-se que esse fato tem importante papel na eliminação de micro-organismos, especialmente do plasmódio [27, 52].

Além dos radicais livres poderem destruir os parasitas no interior da hemácia, contribuem para a ativação do inflamassoma NLRP3 (responsável pela maturação de citocinas como $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\beta$), são essenciais para sinalizações mediadas por receptores como TLR-1, TLR-2 e TLR-3, e colaboram na ativação de linfócitos T e B [41, 48, 52].

Em contrapartida, níveis muito altos dessas espécies químicas causam danos às hemácias e células endoteliais, intensificam o desacoplamento da Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS) ao reduzir a biodisponibilidade de tetrahidrobiopterina (BH_4), que produz mais radicais superóxidos do que óxido nítrico, e favorecem as vias intrínsecas e extrínsecas de apoptose em células endoteliais, exacerbando o dano tecidual (Figura 1) [1, 27, 36].

NADPH Oxidase

Entre as diversas fontes produtoras de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) que participam de processos como esses, a família das NOX é a única que possui como função primária a formação de radicais livres [24]. Presente em granulócitos, macrófagos e naquelas

de origem mesodérmica (células endoteliais, cardiomiócitos etc.), a NOX2 é um complexo proteico multimérico com componentes tanto transmembranares quanto citosólicos [56].

A porção membranar é denominada de flavocitocromo b_{558} e apresenta duas subunidades: o componente catalítico $gp91^{phox}$, onde a região C-terminal possui um domínio com uma Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) conectado e um sítio de ligação para Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida (NADPH), enquanto que a região N-terminal contém seis alfa-hélices transmembranares com quatro resíduos de histidina que interagem com dois hemes orientados perpendicularmente à superfície da membrana; e o componente estabilizador $p22^{phox}$, onde a região C-terminal exibe a Região Rica em Prolina (RRP) e duas alfa-hélices transmembranares (Figura 2A) [30, 40].

As subunidades citosólicas $p47^{phox}$, $p40^{phox}$ e $p67^{phox}$ são encontradas unidas em forma de complexo, assim como a GTPase Rac1/ 2 e a proteína Rho-GDI [40]. Quando o complexo enzimático é estimulado, por exemplo, por TNF- α , IL-1, IL-1 β , quimiocinas ou fagocitose [9, 43], a subunidade $p47^{phox}$ é fosforilada, provocando mudanças estruturais e permitindo a interação com a RRP, conectando o complexo citosólico ao flavocitocromo b_{558} . A Rho-GDI também é fosforilada, o que ocasiona a liberação da Rac-GDP e conversão para Rac-GTP, que, posteriormente, transloca-se independentemente para a membrana e interage com $p67^{phox}$ e a bicamada lipídica [30, 43].

O complexo enzimático ativo funde-se, então, à membrana plasmática ou fagossomal e realiza a função primária: produção de ânions superóxido [39]. Isso acontece através da remoção de elétrons do NADPH citosólico, transportando-os via FAD para os grupos heme presentes no domínio N-terminal, que por sua vez transferem para o oxigênio molecular (O_2) no meio extracelular, catalisando a redução para superóxido (Figura 2B) [7, 8].

A formação de grandes quantidades de ERO por meio do consumo exacerbado de O_2 caracteriza a chamada “explosão respiratória”. O radical produzido pode ser convertido em outros produtos microbicidas, como o H_2O_2 através da SOD e o HClO através da mieloperoxidase [7, 29].

Com o aprimoramento dos métodos de detecção durante a década de 90, a produção de radicais livres foi constatada em vários tipos celulares, além das células fagocitárias. Diferente da $gp91^{phox}$, a $p22^{phox}$ é amplamente expressa, indicando a existência de um heterodímero até então desconhecido [29]. Com base na identificação das subunidades

homólogas a gp91^{phox}, que dispõem do domínio com FAD, sítio de ligação para NADPH e resíduos de histidina conservados, foram descritas ao todo sete isoformas, únicas em termos de distribuição nas células do corpo e da necessidade de subunidades para formar o complexo: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 (Tabela 1) [24]. Entre as subunidades citosólicas, foram encontrados os homólogos NoxO1 e NoxA1, correspondentes respectivamente a p47^{phox} e p67^{phox} [8].

Atividades biológicas da NOX

Por conta da presença em várias linhagens celulares, as isoformas desempenham funções diversas, que vão além da atividade microbicida. Em células dendríticas, a proteólise fagossomal é modulada através da inibição de cisteína-catepsinas por modificação no microambiente redutivo devido a atividade da NOX2 [46]. A eficiência da apresentação cruzada de peptídeos longos depende da ação dessa enzima, visto que é reduzida nas células tratadas com Difenileno-Iodônio (DPI) ou quando possuem deficiência congênita para a enzima [33]. Em linfócitos B, o Complexo do Receptor de Célula B (BCR) é ativado pela quinase Syk após ERO derivado da NOX oxidar a fosfatase SHP-1 [45].

Durante a migração de neutrófilos, o agrupamento de Molécula de Adesão Intercelular-1 (MAI-1) com integrinas favorece a ativação da NOX, o que resulta na ação de quinases que fosforilam e desestabilizam junções aderentes e na atividade do Fator Nuclear kappa beta (FN-κβ), que induz a expressão de várias proteínas, entre elas as moléculas de adesão celular [36]. Nos vasos sanguíneos, NOX1, NOX2 e NOX4 contribuem para a angiogênese, modelagem da matriz extracelular e migração de células endoteliais e de musculares lisas em resposta a fatores de crescimento ou a hipóxia tissular [14, 38, 49].

Devido à variedade de funções biológicas que participam, a família NOX está relacionada a várias doenças, entre elas aterosclerose, hipertensão e derrame [25, 56]. Mutações herdadas no gene codificador da gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox} ou p67^{phox} resultam na Doença Granulomatosa Crônica (DGC), um tipo de imunodeficiência primária em que os fagócitos não conseguem realizar a “explosão respiratória” e assim matar bactérias e fungos, além da propensão maior a desenvolver granulomas [18, 33]. A DGC também está associada a desordens autoinflamatórias e autoimunes [18].

NOX e malária

No que diz respeito a participação na malária, estudos com camundongos *knockout* ou com inibidores são realizados para elucidar o papel da NOX no desenvolvimento da doença. Francischetti *et al.* [14] demonstraram que camundongos C57BL/6J *knockout* para gp91^{phox} infectados com *P. berghei* ANKA tiveram taxa de sobrevivência semelhante ao grupo controle. Além disso, os camundongos selvagens tratados com DPI não exibiram diferença significativa na taxa em relação ao controle. Eles afirmaram que a redundância das outras isoformas da NOX na regulação das ERO compensam a ausência da NOX2.

Resultados diferentes foram encontrados nos trabalhos de Uberti e de Laurindo (2014; dados não publicados). Camundongos swiss infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com apocinina tiveram sobrevida menor que os grupos controles, apesar de não haver alterações significativas na parasitemia e nos perfis oxidante e antioxidante nas amostras pulmonares e cerebrais. As autoras concluíram que o superóxido produzido pela NOX não é a principal ERO envolvida na erradicação do parasito ou no agravamento da doença.

Em um estudo conduzido por Kim *et al.* [28], apenas camundongos C57BL/6 deficientes para NOX4 sucumbiram a infecção pela cepa RH de *Toxoplasma gondii* em menor tempo que os camundongos selvagens e não conseguiram controlar o crescimento da cepa ME49 no cérebro; enquanto que os deficientes para NOX2 ou p47^{phox} não tiveram diferença em relação aos respectivos selvagens. Assim, verificaram que NOX4 atua como a fonte essencial geradora de ERO intracelular e também provê vias de sinalizações intracelulares que levam a expressão do fator de inibição da migração de macrófagos (IMM), citocina essencial para a defesa contra *T. gondii*.

Santiago *et al.* [47] demonstraram que camundongos C57BL/6 *knockout* para gp91^{phox} controlaram proliferação da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, mas não sobreviveram a infecção depois de 20 dias. Os autores inferiram que as ERO desempenham menor participação no controle da infecção e que outros mecanismos podem atuar no controle, como produção compensatória de óxido nítrico, ação de células T CD8+ e fontes celulares alternativas de superóxido e peroxinitrito.

Considerando que pacientes com DGC raramente sofrem com infecções severas por protozoários [47], camundongos *knockout* infectados por *P. berghei*, *T. gondii* ou *T. cruzi* apresentaram resultado semelhantes quanto ao papel da NOX2 no transcurso da doença e no

combate ao invasor. Dessa forma, nos trabalhos com inibidores da NOX2, que mimetizam os efeitos da DGC, era esperado encontrar nenhuma diferença em relação aos grupos controles nesses quesitos.

Mesmo que Andrade *et al.* [1] tenham constatado que níveis elevados de SOD-1 estão associados a severidade de malária vivax, não foi determinado a origem dos superóxidos. Vale lembrar que muitas células apresentam mais de uma isoforma da NOX, além da cadeia transportadora de elétrons ser fonte primária desses radicais e de outras enzimas, como a lipoxigenase, ciclo-oxigenase e NOS, também produzirem esse radical [14, 59]. Por esses motivos, NOX2 não é a fonte mais relevante de superóxido nessas enfermidades.

Considerações finais

Como há pouquíssimos testes de camundongos *knockout* para as isoformas da NOX em infecções por *Plasmodium* sp., os dados não são assertivos para estabelecer com precisão o papel desse complexo enzimático em algum mecanismo fisiopatológico da doença. Todavia, pode-se definir que o complexo não é essencial para a destruição do plasmódio, mas que contribui para a sobrevivência do indivíduo a longo prazo. Como a NOX participa de outros processos biológicos além da resposta imune, há inúmeras abordagens, as quais ainda não foram exploradas.

Uma delas diz respeito a interferência na apresentação de antígenos, o que poderá ajudar a compreender os possíveis mecanismos pelos quais não há imunização estável após exposição ao patógeno. Outra poderá tratar da influência no fenômeno da citoaderência e na disfunção endotelial, visto que as ERO têm participação na expressão de moléculas de adesão celular, na migração de células vasculares e na angiogênese. Esta última poderá contribuir para desenvolver alternativas terapêuticas para prevenção de formas graves da malária.

Tabela 1. Distribuição e estrutura dos sete membros da família da NADPH Oxidase.

ISOFORMA	SUBUNIDADES MEMBRANARES	SUBUNIDADES CITOSÓLICAS	LOCALIZAÇÃO
NOX1	Nox1 e p22 ^{phox} [29]	NoxA1, NoxO1 e Rac [40]	Epitélio do colón, CMLV, células endoteliais e osteoclastos [19]
NOX2	gp91 ^{phox} e p22 ^{phox} [29]	p47 ^{phox} , p67 ^{phox} , p40 ^{phox} e Rac1/2 [40]	Monócitos, linfócitos, células polimorfonucleares, células endoteliais, CMLV e cardiomiócitos [49]
NOX3	Nox3 e p22 ^{phox} [29]	NoxA1 e NoxO1 [40]	Ouvido interno [4]
NOX4	Nox4 e p22 ^{phox} [29]	Ausente [40]	Rins, CMLV, células endoteliais, hepatócitos, cardiomiócitos e neurônios [26]
NOX5	Nox 5 [29]	Ausente [40]	Células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e espermatozoides [49]
DUOX1	Duox1 e DouxA1 [29]	Ausente [40]	Glândula tireoide, mucosa respiratória e mucosa do trato gastrointestinal [51]
DUOX2	Duox2 e DouxA2 [29]	Ausente [40]	Glândula tireoide, mucosa respiratória e mucosa do trato gastrointestinal [51]

Nox: NADPH Oxidase; NoxA: NADPH Oxidase Ativador; NoxO: NADPH Oxidase Organizador; Duox: Dual Oxidase; DuoxA: Dual Oxidase Ativador; CMLV: Células musculares lisas vasculares.

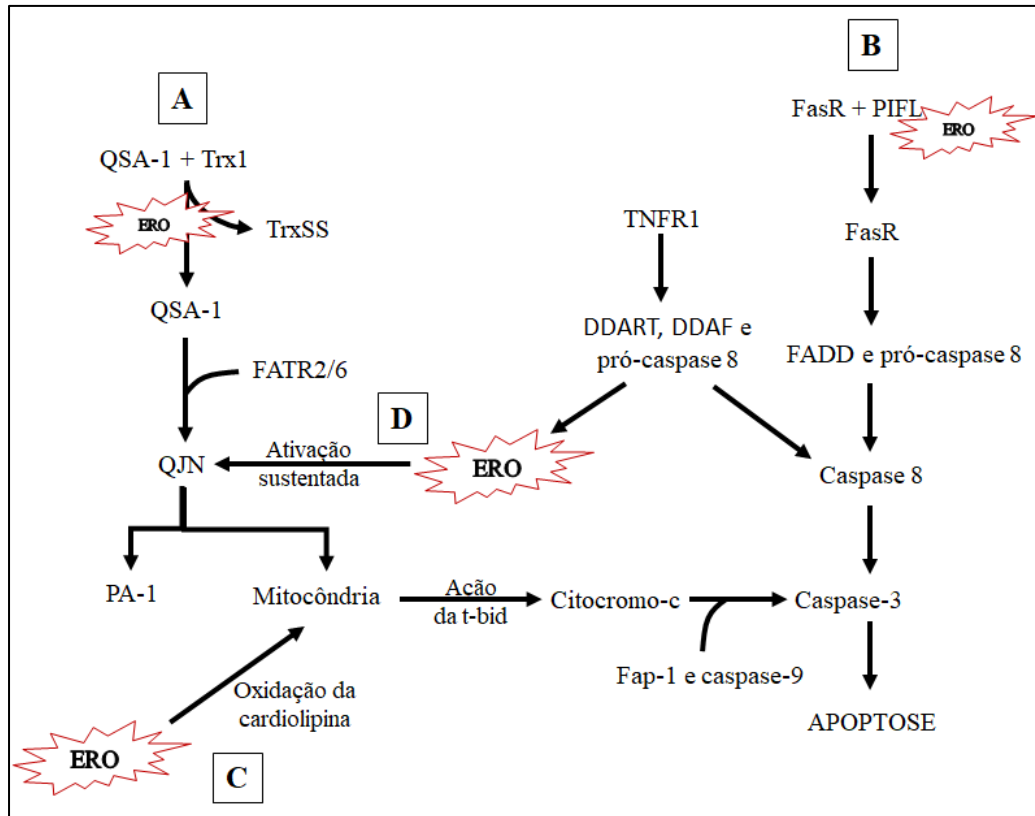


Figura 1. Representação esquemática da atuação das ERO nas vias intrínseca e extrínseca de apoptose, que acontece de várias maneiras, entre elas: A) Oxidação das ligações de dissulfeto entre Trx1 e QSA-1, liberando a QSA-1, que autofosforila, dimeriza e recruta FATR2/6. O novo complexo, por sua vez, ativa QJN, e induz apoptose via mitocôndria ou via transcrição de genes pró-apoptóticos dependentes de PA-1; B) Inativação da proteína inibitória do FasR, que recruta FADD e pró-caspase 8, com posterior ativação de caspase-8; C) Oxidação da cardiolipina, fosfolípido presente na mitocôndria, que favorece a ação da t-bid e facilita a liberação de citocromo-c. No citoplasma, a proteína interage com Fap-1 e caspase-9, resultando na liberação da efetora caspase-3; D) Sustentada ativação da QJN, que causa apoptose dependente da liberação de citocromo-c mitocondrial. TNFR1, ativado após ligação com TNF- α , recruta as proteínas DDART, DDAF e pró-caspase 8, ativando a caspase-8 e induzindo produção intracelular de ERO. A caspase-8 em altas concentrações ativa a caspase-3 independentemente da mitocôndria [11, 16, 36].

Trx1: Tiorredoxina 1; TrxSS: Tiorredoxina oxidada; QSA-1/2: Quinase-1, 2 reguladora de sinal de apoptose; FATR2/ 6: Fator-2, 6 associado ao receptor de TNF- α 2, 6; QJN: Quinase c-Jun N-terminal; PA-1: Proteína ativadora-1; FasR: Receptor de Fas; t-bid: bid truncado; TNFR1: Receptor-1 de TNF; DDART: Domínio de morte associado ao TNFR-1; DDAF: Domínio da morte associado aos Fas; Fap-1: Fator-1 de ativação de apoptose. PIFL: Proteína inibitória FLICE.

Figura 2. Estrutura da NADPH Oxidase 2 em estado de repouso (A) e de ativação (B). A linha roxa representa o caminho percorrido pelo elétron. FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo; GDP: Guanosina Difosfato; GTP: Guanosina Trifosfato. HIS: Histidina; NADP: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidada; NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida; Rho-GDI: Inibidores da Dissociação do Nucleotídeo Guanina Rho-específico; RRP: Região Rica em Prolina; $\cdot\text{O}_2^-$: Ânion superóxido

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, B.B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S.M.; RAFFAELE-NETO, I.; CAMARGO, L.M.A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Plasma Superoxide Dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malária severity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 4: e650. 2010.

2. ANTINORI, S; GALIMBERTI, L; MILAZZO, L; CORBELLINO, M. Biology of human malaria *Plasmodia* including *Plasmodium knowlesi*. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, 4: e2012013. 2012.

3. BAER, K.; ROOSEVELT, M.; CLARKSON, A.B. Jr.; VAN ROOIJEN, N.; SCHNIEDER, T.; FREVERT, U. Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. **Cell Microbiology**, 9: 397–412. 2007.

4. BRANDES, R.P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. Nox Family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. **Free Radical Biology and Medicine**, 76: 208–226. 2014.

5. BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. **Boletim Epidemiológico**, v.46, n.25. 2015. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/18/2015-009---Mal-ria-para-publica----o.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2017.

6. BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. **Boletim Epidemiológico**, v.44, n.1. 2013. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_epidemiologico_numero_1_2013.pdf. Acesso em: 22 dez. 2017.

7. BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER JR, F.J.; KRAUSE, K.H. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, 142: w13659. 2012.

8. BROWN, D.I.; GRIENDLING, K.K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radicals Biology & Medicine**, 47: 1239–1253. 2009.

9. BROWN, G.C. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. **Biochemical Society Transactions**, 35: 1119-1121. 2007.

10. CAMARGO, E.P. Doenças tropicais. **Estudos Avançados**, 22: 95-100. 2008.

11. CIRCU, M.L.; AW, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, **48**: 749–762. 2010.
12. CROMPTON, P.D.; MOEBIUS, J.; PORTUGAL, S.; WAISBERG, M.; HART, G.; GARVER, L.S.; MILLER, L.H.; BARILLAS, C.; PIERCE, S.K. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annual Review of Immunology**, **32**: 157–187. 2014.
13. CUNICO, W.; CARVALHO, S.A.; GOMES, C.R.B.; MARQUES, G. H. Fármacos antimalariais – história e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmácia**, **89**: 49-55. 2008.
14. DRUMMOND, G.R.; SELEMIDIS, S.; GRIENDLING, K.K.; SOBEY, C.G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug discovery**, **10**: 453-471. 2011.
15. FILHO, A.C.A.; LACERDA, M.V G.; OKOSHI, K; OKOSHI, M.P. Malária e o endotélio vascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, **103**: 165-169. 2014.
16. FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **Journal of Cell Biology**, **194**: 7–15. 2011.
17. FRANCISCETTI, I.M.B.; GORDON, E.; BIZZARRO, B.; GERA, N.; ANDRADE, B.B.; OLIVEIRA, F.; MA, D.; ASSUMPÇÃO, T.C.F.; RIBEIRO, J.M.C. *et al.* Tempol, an intracellular Antioxidant, inhibits Tissue Factor expression, attenuates dendritic cell function, and is partially protective in a murine model of cerebral malaria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **9**: e87140. 2014.
18. GARDINER, G.J; DEFFIT, S.N.; MCLEITCHIE, S.; PÉREZ, L; WALLINE C.C.; BLUM, J.S. A role for NADPH oxidase in antigen presentation. **Frontiers in Immunology**, **4**: 295. 2013.
19. GIARDINO, G.; CICALESSE, M.P.; DELMONTE, O.; MIGLIAVACCA, M.; PALTERER, B.; LOFFREDO, L.; CIRILLO, E.; GALLO, V.; VIOLI, F. *et al.* NADPH Oxidase Deficiency: a multisystem approach. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017: 4590127. 2017.
20. GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, **23**: 358-369. 2011.

21. GORRELL, M.D. & WARNER, F.J. Fooling the liver: malaria incognito. **Hepatology**, **45**: 826. 2007.
22. GREENWOOD, B.M.; FIDOCK, D.A.; KYLE, D.E.; KAPPE, S.H.I.; ALONSO, P.L.; COLLINS, F.H.; DUFFY, P.E. Malaria: progress, perils and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation**, **118**: 1266-1276. 2008.
23. HAFALLA, J.C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological Reviews**, **240**: 297-316. 2011.
24. JIANG, F.; ZHANG, Y.; DUSTING, G.J. NADPH Oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. **Pharmacological Reviews**, **63**: 218–242. 2011.
25. KATSUYAMA, M. NOX/NADPH Oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles. **Journal of Pharmacological Sciences**, **114**: 134–146. 2010.
26. KATSUYAMA, M.; MATSUNO, K.; YABE-NISHIMURA, C. Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, **50**: 9–22. 2012.
27. KAVISHE, R.A.; KOENDERINK, J.B.; ALIFRANGIS, M. Oxidative stress in malaria and artemisinin combination therapy: Pros and Cons. **The FEBS Journal**, **284**: 2579-2591. 2017.
28. KIM, J.H.; LEE, J.; BAE, S.J.; KIM, Y.; PARK, B.J.; CHOI, J.W.; KWON, J.; CHA, G.H.; YOO, H.J. *et al.* NADPH oxidase 4 is required for the generation of macrophage migration inhibitory factor and host defense against *Toxoplasma gondii* infection. **Scientific Reports**, **7**: 6361. 2017.
29. LAMBETH, J.D. & NEISH, A.S. Nox enzymes and new thinking on Reactive Oxygen: a double-edged sword revisited. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, **9**: 119-145. 2014.
30. LAMBETH, J.D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, **43**: 319-331. 2007
31. LANGHORNE, J.; NDUNGU, F.M.; SPONAAS, A.; MARSH, K. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature Immunology**, **9**: 725-732. 2008.

32. LEITE, F.H.A.; FONSECA, A.L.; NUNES, R.R.; JÚNIOR, M.C.; VAROTTI, F.P.; TARANTO, A.G. Malária: Dos velhos fármacos aos novos alvos moleculares. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, **2**: 59-76. 2013.
33. MANTEGAZZA, A.R.; SAVINA, A.; VERMEULEN, M.; PÉREZ, L.; GEFFNER, J.; HERMINE, O.; ROSENZWEIG, S.D.; FAURE, F.; AMIGORENA, S. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. **Blood**, **112**: 4712-4722. 2008.
34. MILLER, L.H.; ACKERMAN, H.C.; SU, X.; WELLEMS, T.E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, **19**: 156-167. 2013.
35. MIOTO, L.D.; GALHARDI, L.C.F.; AMARANTE, M.K. Aspectos parasitológicos e imunológicos da malária. **Biosaúde**, **14**: 42-55. 2012.
36. MITTAL, M.; SIDDIQUI, M.R.; TRAN, K.; REDDY, S.P.; MALIK, B. Reactive Oxygen Species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, **20**: 1126-1167. 2014.
37. MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; TSUBOI, T. ; AREVALO-HERRERA, M. ; COLLINS, W. E. ; KING, C. L. Natural Acquisition of Immunity to *Plasmodium vivax*: Epidemiological Observations and Potential Targets. **Advances in Parasitology**, **81**: 77-131. 2013.
38. NAUSEEF, W. M. Biological Roles for the NOX Family NADPH Oxidases. **The Journal of Biological Chemistry**, **283**: 16961–16965. 2008.
39. OLIVEIRA-JUNIOR, E.B.; BUSTAMANTE, J.; NEWBURGER, P.E.; CONDINO-NETO, A. The human NADPH Oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory Burst function and the microbicidal ability of phagocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, **73**: 420-427. 2011.
40. PANDAY, A.; SAHOO, M.K.; OSORIO, D.; BATRA, S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Celular & Molecular Immunology**, **12**: 5-23. 2015.
41. PERCÁRIO, S.; MOREIRA, D.M.; 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. Oxidative Stress in Malaria. **International Journal of Molecular Sciences**, **13**: 16346-16372. 2012.

42. PIMENTEL, L.F.; JÚNIOR, A.T.J.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, **43**: 503-514. 2007.
43. RABÊLO, L.A.; SOUZA, V.N.de; FONSECA, L.J.S.da; SAMPAIO, W.O. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, **94**: 684-693. 2010.
44. RÉNIA, L. & GOH, Y.S. Malaria parasites: the great escape. **Frontiers in Immunology**, **7**: 463. 2016.
45. RETH, M.; DICK, T.P. Voltage control for B cell activation. **Nature Immunology**, **11**: 191-192. 2010.
46. RYBICKA, J.M.; BALCE, D.R.; CHAUDHURI, S.; ALLAN, E.R.; YATES, R.M. Phagosomal proteolysis in dendritic cells is modulated by NADPH oxidase in a pH-independent manner. **The EMBO Journal**, **31**: 932–944. 2012.
47. SANTIAGO, H.C.; GONZALEZ-LOMBANA, C.Z.; MACEDO, J.P.; UTSCH, L.; TAFURI, W.L.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; ALVES, R.O.; ALVES-FILHO, J.C.F.; ROMANHA, A.J. *et al.* NADPH Phagocyte Oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **6**: e1492. 2012.
48. SCHIEBER, M. & CHANDEL, N.S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, **24**: R453-R462. 2014
49. SCHRÖDER, K. NADPH oxidases in redox regulation of cell adhesion and migration. **Antioxidants & Redox Signaling**, **20**: 2043-2058. 2014.
50. SILVA, F.S.A. importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, **3**: 3-17. 2009.
51. SIROKMÁNY, G.; DONKÓ, Á.; GEISZT, M. Nox/ Duox Family of NADPH Oxidases: lessons from knockout mouse models. **Trends in Pharmacological Sciences**, **37**: 318-327. 2016.

52. SPOONER, R. & YILMAZ, Ö. The role of reactive-oxygen-species in microbial persistence and inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, **12**: 334-352. 2011.

53. TAVARES, J.; FORMAGLIO, P.; THIBERGE, S.; MORDELET, E.; VAN ROOIJEN, N.; MEDVINSKY, A.; MÉNARD, R.; AMINO, R. Role of host cell traversal by the malária sporozoite during liver infection. **The Journal of Experimental Medicine**, **210**: 905-915. 2013.

54. USYNIN, I.; KLOTZ, C.; FREVERT, U. Malaria circumsporozoite protein inhibits the respiratory burst in Kupffer cells. **Cellular Microbiology**, **9**: 2610–2628. 2007.

55. WHITE, N.J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T.T.; FAIZ, M.A.; MOKUOLU, O.A.; DONDORP, A.M. Malaria. **Lancet**, **383**: 723-735. 2014.

56. WINGLER, K.; HERMAN, J.J.R.; SCHIFFERS, P.; MOENS, A.L.; PAUL, M.; SCHMIDT, H.H.H.W. NOX1, 2, 4, 5: counting out oxidative stress. **British Journal of Pharmacology**, **164**: 866-883. 2011.

57. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2015**. Geneva: WHO Document Production Services, 2015. 280 p.

58. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2017**. Geneva: WHO Document Production Services, 2017. 196 p.

59. YE, Z.W.; ZHANG, J.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1850**: 1607–1621. 2015.

ANEXOS

ANEXO A - NORMAS DA REVISTA PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS

Diretrizes do autor

ROS usa um sistema de submissão e rastreamento de manuscrito totalmente baseado na web para todos os tipos de manuscritos. Além da sua submissão on-line, a ROS também aceita a submissão de manuscritos por meio de anexos de e-mail. Todos os requisitos/ permissões para envio on-line também se aplicam ao envio de e-mail. Enviar seu manuscrito por e-mail para o ROS significa que você concorda totalmente com os requisitos /permissões estabelecidos no processo de submissão on-line. Para envio de e-mail, envie seu manuscrito por e-mail para: ros.editorial@aimsci.com

O formato para ARTIGOS DE REVISÃO

ROS publica artigos de revisão que abordam tópicos de alto impacto sobre oxigênio reativo e espécies/ entidades relacionadas (incluindo antioxidantes). As referências devem ser primariamente limitadas às publicadas em revistas revisadas por pares de qualidade suficiente, especialmente periódicos de alto impacto. Um jornal de alto impacto geralmente se refere a um que tem um fator de impacto igual ou superior a 10. O NIH/ NIEHS fornece uma lista parcial de periódicos de alto impacto

Página de Título: Contém o título do manuscrito e o nome completo e informações de contato (instituição, endereço postal, endereço de e-mail, número de telefone, etc.) do (s) autor (es) correspondente (s). As abreviaturas, bem como o reconhecimento, se aplicável, podem ser incluídos na Página de Título.

Página do Abstract: **Um resumo não deve conter mais de 250 palavras.** Os resumos que excedem o limite seriam truncados em 250 palavras.

Página de Palavras-chaves: Tipicamente 3-6 palavras-chaves.

Texto principal: Tipicamente não mais de 7.500 palavras, excluindo referências. Ele deve ser dividido em várias seções. As referências devem ser geralmente limitadas a não mais de 100 (consultar “Instruções para prepara a seção de referências” no final de “Diretrizes do autor”).

Ilustrações e legendas: Ilustrações (e.g., figuras, diagramas, esquemas) devem ser tipicamente limitados a não mais de 5 e fornecidas em páginas separadas.

Tabelas e legendas: Tabelas devem ser tipicamente limitados a não mais de 5 e fornecidas em páginas separadas.

Instruções para prepara a seção de referências para manuscritos submetidos a ROS:

- Referências devem ser citadas no texto com um número entre parênteses (e.g., [1]; [1, 2]; [1–3]; [1, 2, 4]). As referências devem ser listadas em ordem numérica no final do documento.
- As referências citadas devem ser de periódicos revisado por pares de qualidade suficiente. Autores são fortemente recomendados a evitar citar artigos publicados em periódicos de baixa qualidade.
- Livros ou capítulo de livros são geralmente considerados como matérias não revisados por pares. Como tal, eles geralmente não devem ser citados como referências para manuscritos (especialmente em artigos de revisão) a serem submetidos a ROS.
- O periódico ROS reformatará as referências de manuscritos aceitos. Como tal, não há requisitos estritos na formatação de referências na submissão.

Lista de verificação de Preparação da Submissão

Como parte do processo de submissão, autores são requeridos a verificar a conformidade da submissão com todos os itens a seguir, e os envios podem ser devolvidos aos autores que não aderem a essas diretrizes.

1. A apresentação não foi publicada anteriormente, nem está sendo submetida a outra revista para consideração.
2. O arquivo de apresentação (manuscrito) está no formato de arquivo de documento do Microsoft Word.
3. O texto do manuscrito é simples ou duplo; com fonte tamanho 12; e todas as ilustrações, figuras e tabelas são colocadas no final do texto. Certifique-se de que todo o manuscrito que inclua todas as suas tabelas e figuras/ ilustrações é montado em um único documento e carregado na Submissão Etapa 2 (Submissão Etapa 2 só permite um único arquivo de upload). Se, no entanto, os arquivos de dados (figuras/ ilustrações, tabelas, etc.) precisam ser carregados separadamente, envie-os na Etapa de envio 4. Todos os materiais de suporte adicionais, incluindo a carta de apresentação, dados suplementares e o Formulário ICMJE para Divulgação de Potenciais Conflitos de Interesse, etc. devem ser carregados separadamente também na Etapa 4 da submissão.