MARCELO LUÍS MONTEIRO PEREIRA

O PAPEL DA HEME OXIGENASE 1 NA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO ASSOCIADA À MALÁRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2016

MARCELO LUÍS MONTEIRO PEREIRA

O PAPEL DA HEME OXIGENASE 1 NA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO ASSOCIADA À MALÁRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Epiphanio

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Bibiblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Pereira, Marcelo Luís Monteiro.
O papel da heme oxigenase 1 na síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária / Marcelo Luís Monteiro Pereira. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Sabrina Epiphanio.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Caracterização da síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária.

Versão do título para o inglês: The role of heme oxygenase 1 in malaria-associated acute respiratory distress syndrome.

1. Endotélio vascular 2. Malária 3. Modelos animais de doenças 4. Permeabilidade vascular animal 5. Plasmodium berghei 6. Sistema respiratório I. Sabrina Epiphanio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB095/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcelo Luís Monteiro Pereira.

Título da Tese: O papel da heme oxigenase 1 na síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária.

Orientador(a): Sabrina Epiphanio.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **146** nas fls. **136** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Sabrina Epiphanio**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"O papel das plaquetas e da hemo oxigenese 1 na injúria pulmonar aguda associada à malária"* do qual participam o(s) aluno(s), especialista em laboratório **Marcelo Luís Monteiro Pereira e os pesquisadores Niels Olsen S. Camara, Cláudio Romero F. Marinho,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **05.10.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 10 de outubro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Este trabalho foi realizado sob orientação da Profa. Dra. Sabrina Epiphanio, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra Sabrina Epiphanio e ao meu co-orientador, Dr Cláudio Marinho, por todo o apoio que me prestaram no planejamento e execução dos experimentos.

A todos os meus colegas e amigos do laboratório de imunoparasitologia (Dr Cláudio Marinho) e do laboratório da Dra Sabrina Epiphanio, pela amizade e pela colaboração na realização de todos os experimentos.

Aos meus pais por sempre terem dado o melhor deles por mim, mesmo a 8 mil quilómetros de distância.

Aos meus primos, Cristina Haibi, Marcus Haibi, Cecília Saito e Newton Saito por todo o apoio e amizade constantes desde a minha chegada ao Brasil.

Aos meus amigos Ana Rita Marques, Gina Polo e Carlos Mera pela amizade genuína e pelos momentos divertidos que tivemos.

“A ciência é muito mais do que um corpo de conhecimento. É uma forma de pensar. Uma maneira cética de interrogar o universo com pleno entendimento da falibilidade humana. ”

Carl Sagan

RESUMO

PEREIRA, M. L. M. **O papel da heme oxigenase 1 na síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária.** 2016. 85 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A malária é uma doença grave causada pelo parasita do gênero *Plasmodium* e que foi responsável por cerca de 440.000 mortes em 2015. A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é uma das principais complicações clínicas da malária. O modelo murino DBA/2 reproduz os sinais clínicos da SDRA observados em humanos, quando infectado com o *Plasmodium berghei* ANKA. Foi demonstrado que a enzima heme oxigenase 1 (HO-1) previne o desenvolvimento da malária grave em camundongos. Além disso, altos níveis de HO-1 foram observados em casos de malária cerebral e em SDRA em humanos. Os nossos dados indicam que a expressão de mRNA da HO-1, bem como os seus níveis proteicos estão aumentados em camundongos que desenvolvem SDRA associada à malária (SDRA-AM). Adicionalmente, a droga indutora de HO-1 (hemina) preveniu o óbito por SDRA-AM, quando administrada antes do início do desenvolvimento da SDRA-AM. Verificou-se também uma redução na permeabilidade vascular pulmonar e nos níveis de VEGF, ambos sinais da SDRA-AM e uma melhoria dos parâmetros respiratórios em animais tratados com hemina. Assim sendo, a indução da HO-1 parece ser protetora e a sua expressão aumentada aquando do desenvolvimento da SDRA-AM pode representar um esforço por parte do hospedeiro em reverter o fenótipo desta síndrome. Sendo que a HO-1 tem um papel protetor na SDRA-AM em modelo murino, esta enzima poderá ser um alvo de novos fármacos, como forma de prevenir o desenvolvimento da SDRA-AM em humanos.

Palavras-chave: Heme-oxigenase-1. Malária. Síndrome do desconforto respiratório agudo.

ABSTRACT

PEREIRA, M. L. M. **The role of heme oxygenase 1 in malaria-associated acute respiratory distress syndrome.** 2016. 85 p. PhD thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Malaria is a serious disease, caused by the parasite of the genus Plasmodium, which was responsible to 440,000 deaths in 2015. Acute lung injury/ acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS) is one of the main clinical complications in severe malaria. The murine model DBA/2 reproduces the clinical signs of ALI/ARDS observed in humans, when infected with *Plasmodium berghei* ANKA. It was demonstrated that the enzyme heme oxygenase 1 (HO-1) prevents mice to develop severe malaria. Also, high levels of HO-1 were reported in cases of cerebral malaria and in ALI/ARDS in humans. Our data have indicated that the HO-1 mRNA and protein expression are increased in mice that develop malaria associated ALI/ARDS (MA-ALI/ARDS). Additionally, a HO-1 inducing drug (hemin) prevented mice from developing MA-ALI/ARDS, when administered before the beginning of the time window during which MA-ALI/ARDS usually develops in this model. Also, there is a decrease in the lung permeability and in lung VEGF levels, which are signs of ALI/ARDS, and an amelioration of respiratory parameters in the animals treated with hemin. Therefore, the induction of HO-1 seems to be protective and their increased expression on the onset of MA-ALI/ARDS development may represent an effort to revert the phenotype of this syndrome by the host. Being HO-1 protective against MA-ALI/ARDS in murine models, this enzyme could be a target of new drugs to prevent the development of MA-ALI/ARDS in humans.

Keywords: Heme Oxygenase-1. Malaria. Acute lung injury / acute respiratory distress syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países onde ocorreu a transmissão de malária em 2013. **18**

Figura 2 - Limites espaciais da transmissão de malária causada por *P. falciparum* e *P. vivax* no Brasil em 2010. **19**

Figura 3 - Ciclo de vida do *Plasmodium*. **20**

Figura 4 – Componentes celulares envolvidos na SDRA associada à malária. **24**

Figura 5 – Reação enzimática da HO-1. **26**

Figura 6 – Método de predição de SDRA ou HP em DBA/2 infectados com Plasmodium berghei ANKA. **37**

Figura 7 – Quantificação da área de tecido que expressa a HO-1, marcada por imuno-histoquímica. **40**

Figura 8 - Esquema de administração de moduladores da HO-1. **42**

Figura 9 - Análise morfométrica de espaços intercelulares. **44**

Figura 10 - Representação do ensaio de permeabilidade endotelial vascular. **45**

Figura 11 - Camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA apresentam dois fenótipos diferentes. **48**

Figura 12 - Camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA que morrem de SDRA apresentam histopatologia pulmonar característica. **51**

Figura 13 - Quantificação da hemozoína em cortes histológicos de pulmão corados com hematoxilina-eosina, por microscopia com luz polarizada. **53**

Figura 14 - A expressão da proteína HO-1 é superior no tecido pulmonar de animais que desenvolvem SDRA. **53**

Figura 15 - A expressão da HO-1 é superior em pulmões de animais que desenvolvem SDRA. **56**

Figura 16 - O tratamento com hemina aumenta a sobrevivência dos animais infectados e melhora os parâmetros respiratórios. **57**

Figura 17 - Camundongos tratados com hemina não possuem edema alveolar e possuem maior área alveolar. **58**

Figura 18 - O tratamento com hemina diminui os níveis de VEGF sérico e a permeabilidade endotelial pulmonar em DBA/2 infectados com *P. beghei* ANKA. **60**

Figura 19 - O tratamento com ZnPPIX não tem efeito na sobrevivência dos animais infectados e nos parâmetros respiratórios. **61**

Figura 20 - O tratamento continuado com ZnPPIX não altera o fenótipo dos animais infectados e não modifica a expressão da HO-1 pulmonar. **62**

Figura 21 - O tratamento com hemina reduz a área dos espaços intercelulares e a permeabilidade em culturas de células endoteliais de pulmão. **64**
Figura 22 – O tratamento com hemina não tem qualquer efeito na morte celular. **66**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALI/ARDS	*Acute lung injury / acute respiratory distress syndrome* (lesão pulmonar aguda / síndrome do desconforto respiratório agudo)
ANOVA	*Analysis of variance* (análise de variância)
AREs	*Antioxidant related elements* (elementos de resposta antioxidante)
CD	*Cluster of differentiation* (grupo de diferenciação)
CD36	*Cluster of differentiation 36* (grupo de diferenciação 36)
CO	*Carbon monoxide* (monóxido de carbono)
COPPIX	*Cobalt protoporfirin IX* (cobalto protoporfirina IX)
DAI	Dia após infecção
ECL	*Enhanced chemiluminescence* (quimiluminescência aumentada)
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)
EP	Eritrócitos parasitados
HE	Hematoxilina-eosina
HP	Hiperparasitemia
HPRT	*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase)
HRP	*Horseradish peroxidase* (proxidase da raiz-forte)
ICAM-1	*Intercellular Adhesion Molecule 1* (molécula de adesão intracelular I)
ICR	*Inprinting Control Region* (região de controle do imprinting)
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-18	Interleucina 18
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G

IP	Intraperitoneal
KO	*Knock-out*
LPS	Lipopolissacarídeo
MA-ALI/ARDS	*Malaria associated acute lung injury/ acute respiratory distress syndrome* (injuria pulmonar aguda/ síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária)
mRNA	*Messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensageiro)
Nlrp3	*NOD-like receptor family pyrin domain containing 3* (proteína receptora do tipo NOD contendo 3 domínios pirina)
PBS	*Phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)
Penh	Enhanced pause (pausa aumentada)
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (reação de cadeia e polimerase)
PVDF	*Polyvinylidene difluoride* (fluoreto de polivinilideno)
RIPA	*Radioimmunoprecipitation assay* (ensaio de radioimunoprecipitação)
RNA	*Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
ROC	*Receiver operating characteristic* (Característica de operação do receptor)
ROS	*Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	*Smal interference RNA* (RNA de interferência curto)
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SDRA-AM	Síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária
SDS	*Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
TNF-α	*Tumor necrosis factor α* (fator de necrose tumoral α)
TUNEL	*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (marcação de "nicks" por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase)
VEGF	*Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)
ZnPPIX	Zinco protoporfirina IX

LISTA DE SÍMBOLOS

^{o}C	Grau Celsius
h	Hora
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
mg/Kg	Miligrama por quilograma
mL	Mililitro
ng	Nanograma
ng/mL	Nanograma por mililitro
pH	Potencial de hidrogênio
RPM	Respiração por minuto
%	Percentagem
V	Volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 Epidemiologia e distribuição geográfica da malária 18
1.2 O ciclo de Vida e a Doença 19
1.3 Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) 21
1.4 Malária grave 22
1.5 Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) associada à malária 23
1.6 A heme oxigenase-1 25
1.7 O papel da heme oxigenase-1 na SDRA 27
1.8 O papel da heme oxigenase-1 na malária 28
1.9 Aumento da permeabilidade vascular pulmonar na SDRA: o papel do VEGF 29
2 OBJETIVOS 32
2.1 Objetivo Geral 33
2.2 Objetivos específicos 33
3 MATERIAL E MÉTODOS 34
3.1 Animais e Parasitas 35
3.2 Medida da capacidade respiratória 35
3.3 O modelo experimental 35
3.4 Histologia 37
3.5 Imuno-histoquímica da HO-1 38
3.6 Medição da expressão de HO-1 por western blot 40
3.7 Reação da polimerase em cadeia com transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR) 40
3.8 Níveis de HO-1, VEGF e bilirrubina no soro de animais DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA 41
3.9 Análise da permeabilidade alvéolo-capilar 41
3.10 Medição dos níveis de citocinas 42
3.11 Modulação da HO-1 42
3.12 Isolamento das células endoteliais pulmonares 43
3.13 Imunofluorescência de microfilamentos de actina 43
3.14 Análise morfométrica de espaços intercelulares 44
3.15 Medida da permeabilidade em células endoteliais primárias de pulmão 44
3.16 Quantificação da morte celular 46
3.17 Análise estatística 46
4 RESULTADOS 47

4.1 A infecção de camundongos DBA/2 com 10^6 eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA leva ao desenvolvimento de SDRA entre o 7º e o 12º DAI 48

4.2 DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA que desenvolvem SDRA apresentam edema alveolar, hemorragias alveolares, infiltrado inflamatório e menor área alveolar 48

4.3 Os níveis de hemozoína são maiores no pulmão de camundongos DBA/2 infectados que apresentam edema alveolar 51

4.4 A expressão da HO-1 é maior em pulmões de animais desenvolvem SDRA do que em animais que desenvolvem HP 53

4.5 O tratamento com hemina aumenta a sobrevivência de DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA, protegendo-os da SDRA 56

4.6 A hemina diminui os níveis de VEGF e a permeabilidade pulmonar em DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA 58

4.7 O ZnPPIX não tem efeito na sobrevivência e nos parâmetros respiratórios de DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA 60

4.8 O tratamento com hemina reduz a permeabilidade em culturas de células endoteliais de pulmão 62

4.9 O tratamento com hemina não tem efeito anti-apoptótico em células endoteliais do pulmão na presença de extrato do parasita 65

5 DISCUSSÃO **67**

6 CONCLUSÕES **73**

REFERÊNCIAS **75**

APÊNDICES **81**

Apêndice A - PEREIRA, M. L. M.; ORTOLAN, L. S.; SERCUNDES, M. K.; DEBONE, D.; MURILLO, O.; LIMA, F. A.; MARINHO, C. R. F.; EPIPHANIO, S. Association of heme oxygenase 1 with lung protection in malaria-associated ALI/ARDS. **Mediators of Inflammation**. Unpublished manuscript. 82

Apêndice B - PEREIRA, M. L. M.; MARINHO, C. R. F.; EPIPHANIO, S. The protective role of heme oxygenase 1 in malaria-associated ALI/ARDS. **Frontiers in Bioscience**. Unpublished manuscript. 84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e distribuição geográfica da malária

A malária é uma doença grave causada pelo parasita *Plasmodium* e transmitida pela picada do mosquito *Anopheles.* Estimou-se que em 2015 ocorreram cerca de 214 milhões de casos de malária, sendo que esta doença vitimou, no mesmo ano, cerca de 440 mil pessoas, a maioria das quais crianças com menos de 5 anos de idade, originárias da África subsaariana (67%). Dos cerca de 3,3 bilhões de pessoas em risco de contrair malária em 2014, 1,1 bilhões viviam em zonas de alto risco (mais do que um caso de malária reportado por cada 1000 habitantes), situadas majoritariamente na África e no sudeste Asiático **(Figura 1)** (WHO, 2014, 2015). As principais espécies causadoras de malária em humanos são *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. As duas primeiras são causadoras do maior número de casos da doença. No Brasil foram registrados cerca de 140 mil casos de malária em 2014, sendo a maioria proveniente da Amazônia Legal e causada pelas espécies *P. falciparum* (17%) e *P. vivax* (83%) (WHO, 2015) **(Figura 2)**.

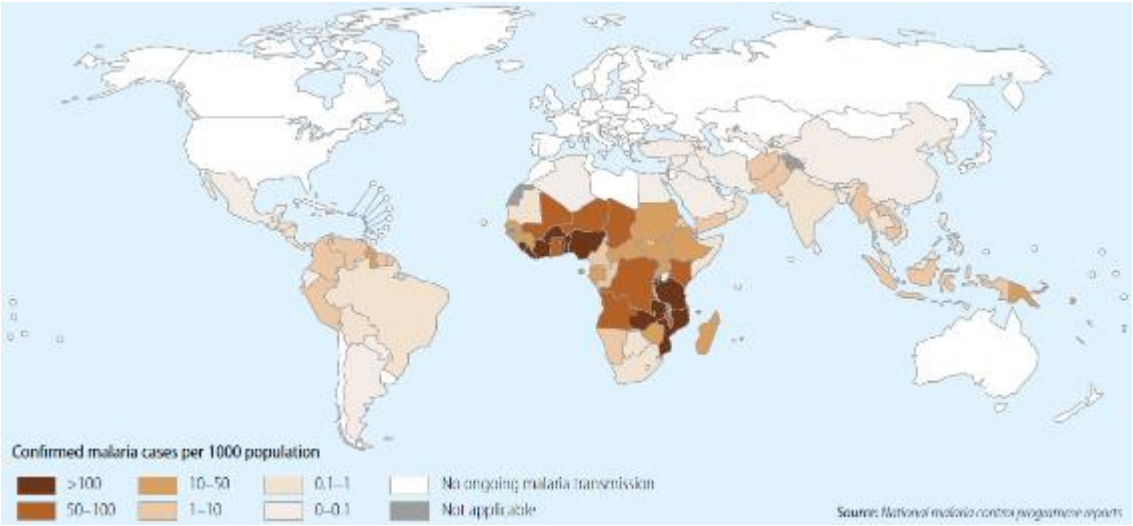


Figura 1- Países onde ocorreu a transmissão de malária em 2013 (WHO, 2014)**.**

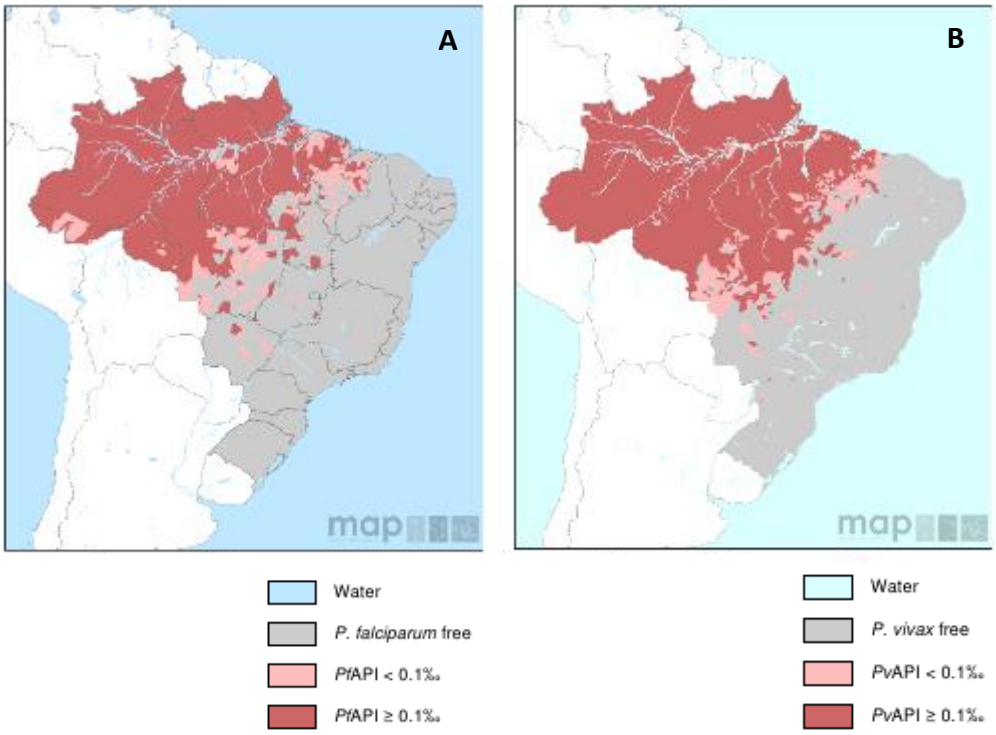


Figura 2 - Limites espaciais da transmissão de malária causada por *P. falciparum* (A) e *P. vivax* (B) no Brasil em 2010 ("Malaria Atlas Project", 2010).

1.2 O ciclo de Vida e a Doença

O ciclo de vida do *Plasmodium* começa quando um mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, possuindo esporozoítos em suas glândulas salivares pica o hospedeiro vertebrado e injeta saliva infectada para a circulação sanguínea. Uma vez no sistema circulatório os esporozoítos alcançam o fígado, onde estabelecem uma infecção primária assintomática intracelular em hepatócitos. Nos 7 a 30 dias seguintes, período entre a infecção e o aparecimento dos primeiros sintomas (7 a 15 dias para *P. falciparum* e *P. vivax* e até 30 dias para *P. malariae*), o parasita diferencia-se em milhares de merozoítos, que são liberados nos sinusóides hepáticos no interior de merossomos (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012; PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006). Os merossomos, por sua vez acumulam-se no pulmão e liberam os merozoítos na microvasculatura pulmonar (BAER *et al.*, 2007). No sangue, estes merozoítos vão, por sua vez, infectar os eritrócitos, iniciando a fase sintomática da doença. O parasita desenvolve-se no interior dos eritrócitos passando por várias fases de desenvolvimento como, anel e trofozoíto, culminando na divisão por esquizogonia com consequente ruptura dos eritrócitos e liberação de merozoítos que, por sua vez irão infectar novos eritrócitos. Além de merozoítos, o desenvolvimento intraeritrocítico pode culminar em

gametócitos (feminino e masculino). Se os gametócitos forem transmitidos a um mosquito que pique um hospedeiro infectado, a fertilização vai ocorrer no seu tubo digestivo, dando origem a um zigoto, que por sua vez se desenvolve em oocisto e em esporozoítos que vão invadir as glândulas salivares do mosquito, tornando-o passível de infectar um novo hospedeiro **(Figura 3)** (GREENWOOD *et al.*, 2008).

A malária é caracterizada por sinais e sintomas como anemia grave, febre, vômitos e fadiga. Durante a fase sintomática da doença podem ocorrer diversas complicações clínicas que no conjunto se definem como malária grave. A malária grave tem sido descrita como uma síndrome complexa que pode afetar vários órgãos e que é, em vários aspectos, semelhante à sepse. Isto torna a malária grave difícil de diagnosticar numa fase inicial, pois pode ser confundida com outras doenças febris, como a pneumonia, a sepse e as infecções do sistema nervoso central. As principais complicações clínicas que caracterizam a malária grave são a anemia aguda, a malária cerebral, a malária placentária, distúrbios renais e hepáticos e a síndrome do desconforto respiratória agudo (SDRA) (CURTIS; FINN; POLLARD, 2013).

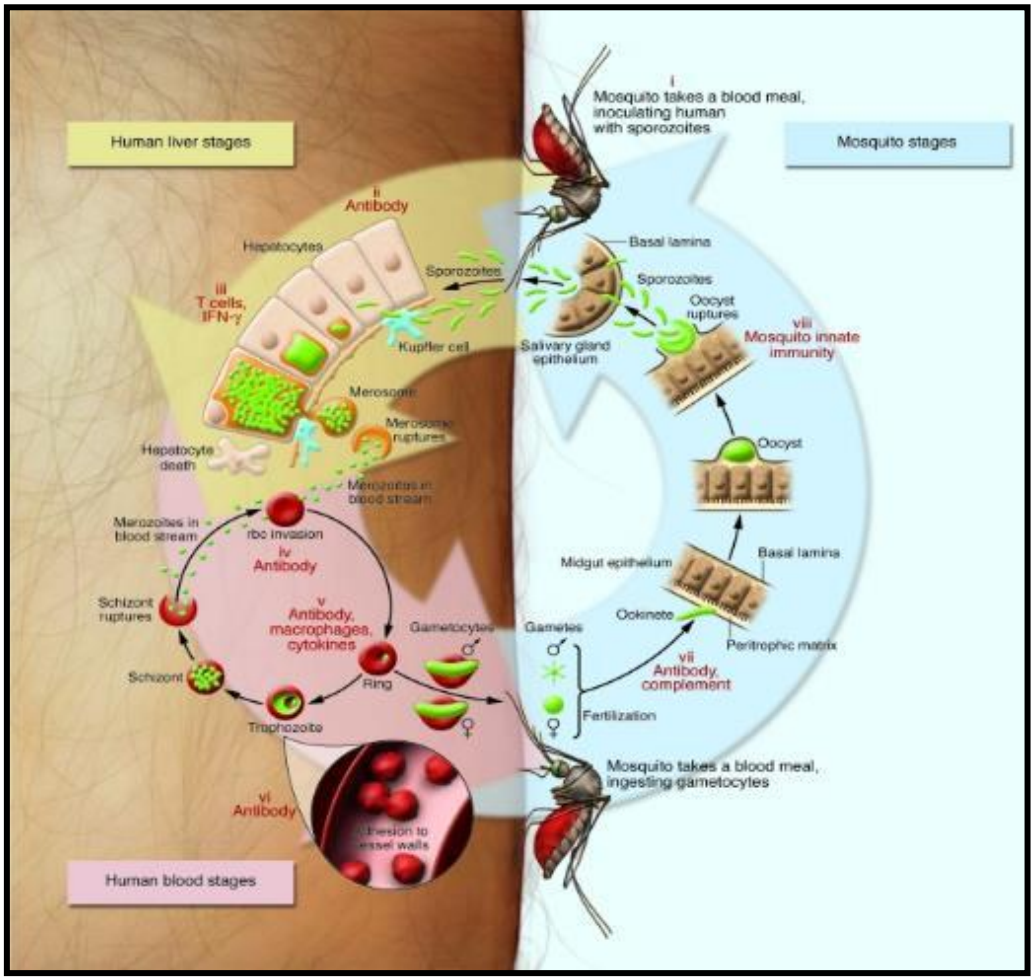


Figura 3 - Ciclo de vida do *Plasmodium* (GREENWOOD *et al.*, 2008).

1.3 Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA)

A primeira descrição de SDRA foi feita em 1967 como uma síndrome que apresentava sinais de dispneia grave, taquipneia, hipoxemia, perda de complacência pulmonar e presença de infiltrado alveolar difuso, detectado por raio X torácico (ASHBAUGH *et al.*, 1967). De acordo com a definição de Berlim de 2012, a SDRA em humanos define-se em três subcategorias, dependendo do grau de hipoxemia: benigna (200 mm Hg $<PaO_2/FIO_2 \leq 300$ mmHg), moderada (100 mmHg $<PaO_2/FIO_2 \leq 200$ mmHg) e grave ($PaO_2/FIO_2 \leq 100$ mmHg). Desta forma o termo lesão pulmonar aguda (LPA) usado para designar uma forma menos grave da doença, foi abandonado, sendo unicamente usado o termo SDRA. Além disso, outros critérios foram tidos em conta na definição de SDRA, tais como: opacidades bilaterais detectadas por raio X ao tórax ou por tomografia computadorizada. O início dos sinais da SDRA ocorre em até uma semana após o estímulo que levou aos sintomas, ou após a piora ou o aparecimento de novos sinais e sintomas respiratórios; o edema não pode ser cardiogênico; a pressão expiratória final positiva deve ser igual ou superior a 5 cm H_2O para a SDRA benigna e igual ou superior a 10 cm H_2O para a SDRA grave; o volume expirado por minuto corrigido deve ser maior do que 10 L/min e/ou deve existir uma baixa complacência do sistema respiratório (menor do que 40 mL/cm H_2O) (RANIERI *et al.*, 2012).

A SDRA afeta mais adultos do que crianças, possui uma elevada taxa de mortalidade e é caracterizada por dispneia, taquipneia e hipoxemia que progride rapidamente para um quadro de insuficiência respiratória aguda caracterizado por complacência pulmonar reduzida, aumento da atividade fagocitária e aumento dos níveis de mediadores inflamatórios (MONAHAN, 2013). As causas mais comuns da SDRA em humanos são as pneumonias bacterianas ou virais. Além destas, existem outras origens frequentes, como a sepse derivada de infecções não pulmonares, a aspiração de suco gástrico e o traumatismo severo. Outras causas mais raras são a pancreatite aguda, transfusões, reações adversas a fármacos e infecções fúngicas ou parasitárias do pulmão (MATTHAY; WARE; ZIMMERMAN, 2012).
Em modelos animais existe evidência de que a lesão pulmonar aguda associada à hiperoxia leva à presença de elevados níveis de espécies reativas do oxigênio, que danificam as células endoteliais e epiteliais do pulmão, incluindo os pneumócitos do tipo I (morte celular) e causam danos na membrana basal (THIEL *et al.*, 2005; ZHANG, XUCHEN *et al.*, 2003). Além disso, pensa-se que as respostas do endotélio também são importantes na proteção contra a morte induzida por hiperoxia devido ao fato de as células endoteliais constituírem mais de 30% de todas as células pulmonares (CRAPO *et al.*, 1982). Uma das mais graves

consequências da SDRA é a falha de múltiplos órgãos. Evidências clínicas recentes especificaram que estratégias protetoras do endotélio podem prevenir a falha de múltiplos órgãos (LANGOUCHE *et al.*, 2005; ZHANG, XUCHEN *et al.*, 2006).

1.4 Malária grave

A espécie *P. falciparum* é a mais virulenta, a qual predomina na África. Por outro lado, a espécie *P. vivax* é menos virulenta e está mais amplamente distribuída pelo mundo de que *P. falciparum* (WHO, 2015). Apesar disso, ambas as espécies são responsáveis por casos de malária grave (BAIRD, 2013; LACERDA *et al.*, 2012; RAHIMI *et al.*, 2014).

Os principais eventos fisiopatológicos que ocorrem durante a infecção por malária são: a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a adesão de eritrócitos parasitados (EP) às células endoteliais de capilares e vênulas, particularmente importante em *P. falciparum*, cuja proteína Pfemp1 é responsável pela ligação a receptores do hospedeiro, como o CD36 e o ICAM-1 (BARUCH *et al.*, 1996). Ademais, a remoção de eritrócitos parasitados da corrente sanguínea pelos macrófagos esplênicos e a ruptura de eritrócitos parasitados com consequente liberação de fatores que vão ativar a resposta inflamatória, como o glicosilfosfatidilinositol, a hemozoína (pigmento malárico), o DNA e precipitados de ácido úrico derivados do parasita, que ao interagirem com receptores TLR da imunidade inata, como o TLR9 (hemozoina e DNA), conduzem a uma activação da reposta inflamatória (GALLEGO-DELGADO *et al.*, 2014; GAZZINELLI *et al.*, 2014; GUPTE, 2013). Estes eventos estão associados entre si e são responsáveis pelas principais síndromes que estão associadas à malária. Os macrófagos esplênicos e os monócitos são os principais responsáveis pela liberação de mediadores pró-inflamatórios (BORGES DA SILVA *et al.*, 2015). Isto deve-se ao fato de estas células estarem expostas a um elevado número de eritrócitos infectados da corrente sanguínea e por serem responsáveis pela detecção e fagocitose desses eritrócitos (DEL PORTILLO *et al.*, 2012). Apesar disso, a anemia severa, uma das formas mais comuns de malária grave, não pode ser explicada apenas pelo fenômeno de remoção de eritrócitos parasitados pelo baço. Além disso, tem sido proposto o efeito supressor da eritropoiese pelas citocinas pró-inflamatórias (GAZZINELLI *et al.*, 2014). Para além dos macrófagos e dos monócitos, as células T CD4+, as células T gama-delta e as células NK são também responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, o IFN-γ e o TNF-α, numa fase precoce da infecção por plasmódio em humanos. Dentre estas células, os monócitos CD14+ destacam-se pela produção de TNF e quimiocinas, enquanto nas células T CD4+ predomina a expressão de IL-10. O envolvimento de mediadores inflamatórios, como IL-6, MIP-1α, MIP-

1β e MCP-2 e da citocina anti-inflamatória IL-10, está associado a uma maior probabilidade de ocorrência de malária grave em humanos (STANISIC *et al.*, 2014).

A adesão de eritrócitos parasitados ao endotélio é um fenômeno importante no desenvolvimento de formas graves da malária, como a malária cerebral (IDRO *et al.*, 2010) e a malária placentária (COSTA *et al.*, 2006; UMBERS; AITKEN; ROGERSON, 2011). Em relação à SDRA associada à malária, existem ainda poucos estudos sobre a possível importância deste fenômeno, tanto *in vivo* (CORBETT *et al.*, 1989) como *in vitro* (CARVALHO *et al.*, 2010; MUANZA *et al.*, 1996). Receptores do hospedeiro, como ICAM-1 (CARVALHO *et al.*, 2010) e CD36 (BARNWELL *et al.*, 1989; BARUCH *et al.*, 1996, 1997; CHEN, Q *et al.*, 2000; OQUENDO *et al.*, 1989) estão envolvidos na adesão ao endotélio de EP leucócitos e plaquetas (KIRCHGATTER; DEL PORTILLO, 2005; SHERMAN; EDA; WINOGRAD, 2003; WASSMER; COMBES; GRAU, 2003).

A participação de diversas células do sistema imunitário e de células endoteliais em diversos órgãos no aparecimento dos primeiros sinais de malária reforça a hipótese de envolvimento de múltiplos fatores do hospedeiro para o desenvolvimento das síndromes de malária severa como a SDRA e a malária cerebral.

1.5 Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) associada à malária

Os mecanismos fundamentais da fase inicial e da propagação da SDRA não estão ainda bem definidos, no entanto, sabe-se que a entrada de fluido intravascular nos pulmões, resultante do aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos alveolares, é o mecanismo fisiopatológico chave da SDRA associada à malária (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008). Neste aumento da permeabilidade estão, possivelmente, envolvidos múltiplos fatores como a injúria do endotélio causada pela adesão de EP, o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF-α, a interleucina 1 (IL-1) ou as interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8), e ainda, a obstrução endovascular associada à acumulação de eritrócitos com reduzida deformabilidade, EP e leucócitos (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008) **(Figura 4)**. Esta síndrome pode estar também associada a outros fatores como a insuficiência cardíaca ou a taquipneia associada à malária cerebral (GOOD *et al.*, 2005). Entretanto, tem sido demonstrado que a gênese da SDRA associada à malária é multifatorial e que as hipóteses de adesão ao endotélio, inflamação e hemostasia, envolvidas na patogênese da malária severa,

especialmente da malária cerebral (VAN DER HEYDE *et al.*, 2006), sejam também relevantes no desenvolvimento da SDRA associada à malária.

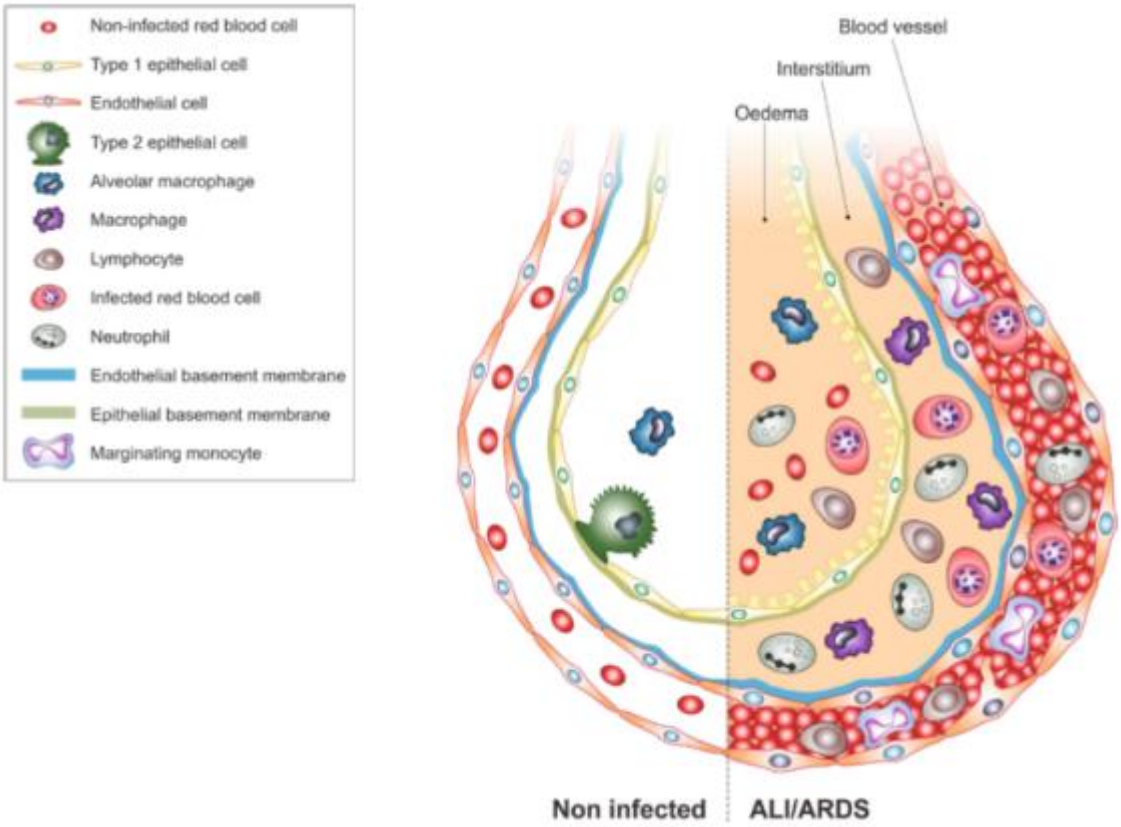


Figura 4 – Componentes celulares envolvidos na SDRA associada à malária (AITKEN *et al*., 2014).

A SDRA já foi diagnosticada em pacientes sofrendo malária causada por todas as espécies responsáveis por esta doença nos humanos, incluindo *Plasmodium knowlesi* (SINGH; DANESHVAR, 2013), no entanto, é mais comum em *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; PRICE *et al.*, 2007).

Modelos murinos são uma importante ponte entre o paciente de uma zona endêmica e o laboratório de pesquisa. Hipóteses emergentes de estudos humanos podem ser facilmente testadas em modelos animais e fornecem valiosas informações sobre a patogenia das enfermidades. Nesse sentido, foram desenvolvidos diferentes modelos em roedores para o estudo da SDRA associada à malária, que demonstram aspectos semelhantes à SDRA humana (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; HEE *et al.*, 2011; LOVEGROVE *et al.*, 2008; VAN DEN STEEN *et al.*, 2010). Camundongos da linhagem DBA/2 quando infectados com o parasita *Plasmodium berghei* ANKA, desenvolvem SDRA (EPIPHANIO *et al.*, 2010a). Entre 30 e 60% dos camundongos desta linhagem que morrem entre os dias 7 e 12 após infeção apresentam dispneia, hipoxemia e redução da capacidade respiratória. Estudos *post-mortem*

revelaram que estes camundongos apresentavam efusão pleural, contendo células como neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos. Ademais, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) foi identificado como fundamental no aumento da permeabilidade vascular pulmonar, um marco da SDRA (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; PENA *et al.*, 2012). Em outro modelo, camundongos C57BL/6, quando infectados com o parasita *P. berghei* NK65 desenvolveram um quadro de malária grave caracterizado por infiltrado inflamatório e edema alveolar e intersticial no pulmão e formação de membranas hialinas, o que é típico da SDRA (VAN DEN STEEN *et al.*, 2010). Neste modelo, cerca de 90% dos camundongos infectados morrem com um quadro de malária grave típico de SDRA, sem desenvolver malária cerebral, o que o torna um modelo útil no estudo da SDRA associada à malária. Por último, demonstrou-se que a infecção de camundongos da linhagem C57BL/6 com o parasita *P. berghei* NK65 ^{GFP} levou a que estes desenvolvessem SDRA com uma incidência próxima de 100% (dados não publicados). Assim sendo, qualquer um destes três modelos aqui descritos é adequado para o estudo da SDRA associada à malária.

1.6 A heme oxigenase-1

O sistema heme oxigenase tem sido intensamente estudado devido às suas propriedades regulatórias tanto em processos fisiológicos, quanto patológicos. A HO-1 é uma enzima codificada pelo gene *hmox-1*, o qual é considerado um gene “protetor” devido a suas propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas e anti-proliferativas em diferentes tipos celulares, incluindo as células endoteliais (SOARES *et al.*, 1998). Esta enzima participa na degradação do heme livre em quantidades equimolares de CO, ferro e biliverdina. A biliverdina é posteriormente reduzida a bilirrubina pela enzima biliverdina redutase (DULAK *et al.*, 2008) **(Figura 5)**.

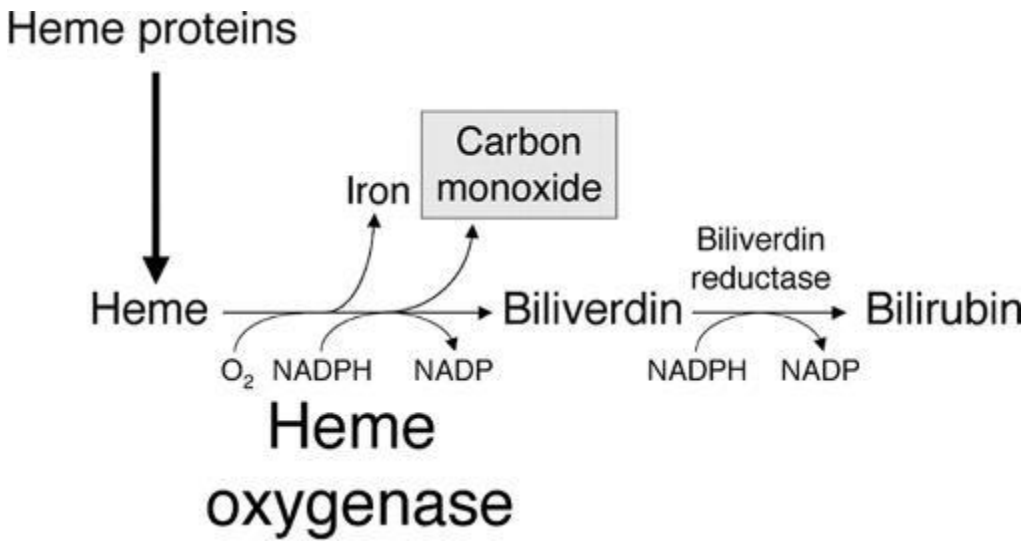


Figura 5 – **Reação enzimática da HO-1** (DULAK *et al.*, 2008).

O heme é derivado de proteínas, tais como a hemoglobina e a mioglobina. A HO-1 é expressa em todas as células em baixos níveis, mas é rapidamente induzível por estímulos variados, tais como heme livre, heme-hemopexina, radiação ultravioleta A, peróxido de hidrogênio, citocinas IL-1, IL-6, TNF-α, IFN-γ, endotoxina, PDGF, TGF, VEGF, metais pesados, lipoproteínas oxidadas de baixa densidade, hiperoxia, óxido nítrico, doadores de óxido nítrico, dopamina e todos os estímulos que induzem uma mudança considerável no potencial redox celular (AGARWAL; BOLISETTY, 2013; HILL-KAPTURCZAK; CHANG; AGARWAL, 2002).

A heme oxigenase possui duas isoformas: HO-1, induzível e heme oxigenase-2 (HO-2), constitutiva. A atividade enzimática de ambas é idêntica. A HO-2, possivelmente, regula as funções fisiológicas normais das células, enquanto que a HO-1 é expressa em todas as células e é altamente induzível por uma variedade de estímulos (AGARWAL; BOLISETTY, 2013). Esta enzima desempenha um papel protetor na modulação da resposta tecidual à injúria em vários órgãos, incluindo o pulmão (injúria pulmonar associada à hiperoxia (ZHANG, YI *et al.*, 2013), hipertensão pulmonar (CHRISTOU *et al.*, 2000) e fibrose pulmonar (TSUBURAI *et al.*, 2002)).

Sendo assim, a HO-1 confere proteção celular através de:

- degradação do heme livre, que tem efeitos pró-oxidantes (BALLA *et al.*, 1991; TRACZ; ALAM; NATH, 2007);
- produtos da reação da HO-1 que contribuem para a resposta protetora (MOTTERLINI; OTTERBEIN, 2010; NAKAGAMI *et al.*, 1993; STOCKER *et al.*, 1987).

Em resposta ao estresse oxidativo as células alteram a sua expressão gênica de maneira a ativar genes que codificam proteínas responsáveis pela proteção contra esse estresse. O fator de transcrição Nrf2, juntamente com os seus genes alvo (envolvidos na proteção celular antioxidativa), são importantes na proteção contra espécies reativas do oxigênio (ROS), espécies reativas do nitrogênio, e dano celular. O Nrf2 está localizado no citoplasma, associado à proteína Keap1. Esta proteína é responsável pela ubiquitinação constante de Nrf2, o que leva à sua degradação no citoplasma. Em resposta ao estresse oxidativo Nrf2 é libertado de Keap1 e, posteriormente, translocado para o núcleo. No núcleo, Nrf2 forma um hetero-dímero com a proteína Maf e liga-se a elementos relacionados com antioxidantes (AREs) na região promotora de determinados genes citoprotetores, entre os quais hmox1, que codifica a proteína HO-1 (JOO CHOI; CHENG; SHIK KIM, 2014). Um composto denominado "desoxyrhapontigenin" diminuiu a produção de ROS e de peroxinitrito e induziu a HO-1 através da ativação por Nrf2 e da inibição por Keap 1. Este fármaco levou ainda a uma melhoria da inflamação pulmonar induzida por LPS (*lipopolysaccharide*) em camundongos ICR (*Inprinting Control Region*) (JOO CHOI; CHENG; SHIK KIM, 2014).

As ferramentas disponíveis para o estudo da HO-1 em diferentes doenças, são as drogas indutoras (hemina, cobalto protoporfirina IX) e inibidores químicos, como zinco protoporfirina IX. O gene da HO-1 pode ser deletado, constituindo camundongos HO-1 deficientes (HO-1 knockout). No entanto, os ensaios valendo-se de camundongos HO-1-KO apresentam os seguintes problemas: letalidade parcial da deleção de HO-1 para o desenvolvimento pré-natal; a deposição de ferro nos tecidos pode afetar os resultados dos experimentos. Porém, os inibidores químicos da HO-1 têm a desvantagem de serem inespecíficos. Num esforço de contornar estes problemas, verificou-se que a inibição específica da HO-1 pulmonar através de RNA de interferência (siRNA) permitiu estudar o efeito do silenciamento da HO-1 pós-natal em células específicas (SINER *et al.*, 2007; ZHANG, XUCHEN *et al.*, 2004; ZHANG, YI *et al.*, 2013).

1.7 O papel da heme oxigenase-1 na SDRA

Em ratos, a indução da expressão da HO-1 levou à redução da injúria pulmonar resultante da presença de LPS bacteriano no sangue (OTTERBEIN; SYLVESTER; CHOI, 1995). Também foi demonstrado que a inibição da HO-1 levou a um agravamento dos sinais

de SDRA em ratos após isquemia-reperfusão (I/R) dos membros inferiores (BOUTROS *et al.*, 2005).

Em modelos murinos, demonstrou-se que a hemina, um indutor da HO-1, inibiu o recrutamento de células inflamatórias e reduziu a ativação do inflamassoma NLRP3 na injúria pulmonar aguda induzida pela sepse (LUO *et al.*, 2014). O inflamassoma NLRP3 regula a maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-18. O complexo é formado pelas proteínas NLRP3, ASC e caspase-1. Devido a um estímulo endógeno ou exógeno, o inflamassoma forma-se através da ativação da proteína NLRP3 e recrutamento de ASC e da pró-caspase-1. Isto resulta na ativação da caspase-1 e subsequente processamento das citocinas pró-IL-1β e pró-IL-18 nas suas formas ativas (ANAND; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2011; SCHRODER; TSCHOPP, 2010). O inflamassoma NLRP3 pode ser ativado por vários fatores estimulantes tais como, bactérias, vírus, fungos e componentes resultantes da morte celular (ANAND; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2011). A ativação desregulada de NLRP3 está presente na SDRA associada à aspiração de LPS e as citocinas associadas ao inflamassoma, pertencentes à família de citocinas IL-1, são responsáveis pela propagação da resposta inflamatória (GRAILER *et al.*, 2014). Não menos importante, os níveis de marcadores de estresse oxidativo no tecido pulmonar, reduziram em animais com sepse tratados com hemina (LUO *et al.*, 2014).

Por fim, o *knockdown* da HO-1 pulmonar levou a um agravamento da injúria pulmonar resultante de hiperoxia, com consequente aumento da apoptose das células endoteliais pulmonares, aumento dos níveis de ROS e de proteína no lavado broncoalveolar e aumento dos níveis das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α (ZHANG, YI *et al.*, 2013). Este estudo permitiu assim determinar o papel da HO-1 no pulmão, em casos de hiperoxia, sendo possível determinar qual a contribuição da HO-1 para a patogênese desta doença em diferentes células do pulmão. No entanto, estudos como este são dispendiosos e complexos pelo que, geralmente se opta pela utilização de camundongos HO-1 *knockout* ou de inibidores químicos, como o ZnPPIX, para o estudo da HO-1.

1.8 O papel da heme oxigenase-1 na malária

Diversos estudos sustentam a hipótese de que na malária grave, a enzima HO-1 e o CO têm um papel protetor (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; PAMPLONA *et al.*, 2007; PENA *et al.*, 2012). Entretanto, níveis elevados de HO-1 nos leucócitos do sangue periférico e no plasma

foram associados à malária grave em crianças gambianas (WALTHER *et al.*, 2012). Adicionalmente a HO-1 foi também detectada em elevados níveis nos monócitos e macrófagos residentes do cérebro, pulmão e fígado de humanos com malária grave (CLARK *et al.*, 2003). Tal como em casos de hiperoxia, endotoxemia e I/R, a infeção por malária leva à liberação de espécies reativas de oxigênio e heme livre, prejudiciais para as células endoteliais do hospedeiro. Quando expostas ao heme livre, as células do hospedeiro aumentam a expressão da HO-1 (FERREIRA *et al.*, 2008).

Em camundongos da linhagem C57BL/6, tanto a indução da HO-1 com cobalto protoporfirina IX (CoPPIX), como o tratamento com monóxido de carbono (CO) suprimiram a patogênese da malária cerebral experimental, prevenindo a ruptura da barreira hematoencefálica, bem como reduzindo a neuroinflamação (PAMPLONA *et al.*, 2007). No entanto, a inibição química da HO-1 com a ZnPPIX não teve efeito na patogênese em camundongos C57BL/6. Apesar disso, neste estudo, foram utilizados camundongos HO-1-KO, cujo *background* é a linhagem Balb/c (os quais não desenvolvem malária cerebral), e foi observado o desenvolvimento de sinais similares à malária cerebral.

Recentemente, foi demonstrado em DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA que a administração exógena de CO suprime a SDRA e que altos níveis de VEGF estão associados ao desenvolvimento desta lesão (EPIPHANIO *et al.*, 2010a). Ademais, Siner e colaboradores demonstraram que o VEGF é um potente indutor da enzima HO-1 e que a indução desta enzima reduziu a injúria pulmonar aguda causada por hiperoxia em camundongos (SINER *et al.*, 2007).

Apesar de a maior parte dos estudos da HO-1 concluírem que esta enzima tem um papel protetor no desenvolvimento de diferentes doenças, como a SDRA, o papel da HO-1 na SDRA associada à malária é pouco conhecido, por isso, o objetivo principal deste estudo foi verificar a sua importância na patogênese desta síndrome em camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA.

1.9 Aumento da permeabilidade vascular pulmonar na SDRA: o papel do VEGF

O aumento da permeabilidade vascular pulmonar é um fator chave na gênese da SDRA. Este aumento de permeabilidade já foi verificado em casos de SDRA associada à sepse e de pneumonia em humanos, com consequente incapacidade de remoção do fluido

alveolar por parte do epitélio alveolar (CONSTANTIN *et al.*, 2007; HOLTER *et al.*, 1986; JABAUDON *et al.*, 2016). Em modelos murinos verificou-se que a permeabilidade vascular pulmonar está presente na ARDS induzida por LPS (KONRAD *et al.*, 2016; MENG *et al.*, 2015).

A remoção do fluido alveolar dos alvéolos pulmonares para o espaço intersticial é realizada pela atividade das bombas de sódio-potássio e pela ATPase nas células epiteliais alveolares. Durante a SDRA não só o epitélio alveolar é afetado mas também o endotélio, com a formação de espaços entre as junções das células endoteliais (GONZALES; LUCAS; VERIN, 2015). Estes espaços são formados devido a um remodelamento do citoesqueleto das células endoteliais, induzido por fatores como o VEGF (SUKRITI *et al.*, 2014). O entendimento dos mecanismos envolvendo o VEGF endotelial *in vivo* pode ter implicações terapêuticas importantes.

Apesar de amplamente distribuído em muitos órgãos, o VEGF está presente nos pulmões em elevados níveis, no entanto a sua função não é ainda bem compreendida (MEDFORD *et al.*, 2009; NG *et al.*, 2001). VEGF é uma família de glicoproteínas dimórficas que se inclui na superfamília de PDGF. Apesar de ser apenas um entre muitos fatores de crescimento, o VEGF é necessário para uma vasculogênese bem-sucedida, bem como para a manutenção da permeabilidade vascular e possui propriedades mitogênicas e de sobrevivência das células endoteliais envolvidas na angiogênese (DRAKE *et al.*, 2000; GERBER; DIXIT; FERRARA, 1998). Em culturas de células endoteliais o VEGF previne a apoptose, possivelmente através da indução de proteínas anti-apoptóticas tais como aquelas pertencentes à família Bcl-2, que estabilizam as membranas mitocondriais (GERBER; DIXIT; FERRARA, 1998). Adicionalmente mostrou-se que, num modelo *in vivo*, a proteína IL-13 tem um papel protetor durante a hiperoxia e que a proteção é em grande parte devido à sua habilidade para induzir a expressão de VEGF no parênquima pulmonar, vasos sanguíneos, vias respiratórias e macrófagos alveolares (CORNE *et al.*, 2000). Além disso, mostrou-se que, camundongos transgênicos que sobre expressam o VEGF estão protegidos da SDRA associada à hiperoxia, em parte através da indução da proteína anti-apoptótica A1, da família Bcl (HE *et al.*, 2005; WAXMAN *et al.*, 1998). No entanto, em outros estudos, como o do modelo de SDRA associada à malária, o VEGF tem um papel deletério (EPIPHANIO *et al.*, 2010b). Sendo assim o papel do VEGF na proteção contra a lesão pulmonar parece ser controverso e depende do modelo em estudo.

Os níveis de VEGF estão aumentados em camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; ORTOLAN *et al.*, 2014). Além disso, os níveis de permeabilidade endotelial pulmonar estão aumentados nos mesmos camundongos, que também apresentam edema alveolar e efusão pleural (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; ORTOLAN *et al.*, 2014). Dado que a HO-1 reduziu a permeabilidade pulmonar em outros modelos de SDRA induzida por LPS (KONRAD *et al.*, 2016) e protegeu o modelo murinho C57BL/6 da malária cerebral (PAMPLONA *et al.*, 2007), o objetivo principal deste projeto foi verificar se HO-1 tem um papel protetor contra a SDRA associada à malária.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi determinar o papel da HO-1 no desenvolvimento da SDRA associada à malária em modelo experimental murino.

2.2 Objetivos específicos

a) estudar a expressão da HO-1 nos pulmões durante o desenvolvimento da SDRA;

b) verificar os níveis séricos de HO-1 e de bilirrubina nos animais que desenvolvem SDRA em relação aos animais que desenvolvem HP;

c) avaliar o fenótipo dos animais infectados após a indução e a inibição da HO-1;

d) medir a permeabilidade endotelial pulmonar em animais infectados e em células endoteliais pulmonares, após indução da HO-1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Parasitas

Foram utilizados camundongos machos adultos (6 a 10 semanas de idade) da linhagem DBA/2 infectados com 10^6 eritrócitos parasitados de *P. berghei* ANKA. Os animais foram criados e fornecidos pelo Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e foram mantidos em estantes ventiladas, sob condições controladas de umidade, iluminação e temperatura e com acesso livre a alimento e a água. A eutanásia foi realizada com a associação anestésica de quetamina (150 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg). Também foram utilizados camundongos não infectados em cada experimento. Todos os procedimentos que envolveram experimentação animal estavam de acordo com o regulamento nacional de bem-estar e experimentação animal e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), N° 14613602, anexo a esta tese (página 4). As parasitemias dos animais foram calculadas por determinação do valor da média de percentagem de eritrócitos parasitados por eritrócitos totais em esfregaços sanguíneos fixados com metanol e corados com Giemsa. Pelo menos quatro campos de microscópio óptico, com a objetiva de 100 x (ampliação total de 1000 x), foram usados para contagem de eritrócitos.

3.2 Medida da capacidade respiratória

Os parâmetros respiratórios foram monitorados no 7º DAI. Os camundongos foram colocados em uma câmara de pletismografia (WBP, Buxco Electronics, Wilmington, Carolina do Norte, EUA) durante 10 minutos, tal como descrito anteriormente (ORTOLAN *et al.*, 2014). Os dados foram coletados por meio de software Biosystems XA e incluíram a frequência respiratória (respirações por minuto) e a pausa aumentada (Penh), uma variável teórica que se correlaciona com a resistência pulmonar e a pressão intrapleural (HAMELMANN *et al.*, 1997). O Penh é calculado pela seguinte fórmula (LOMASK, 2006):

$$Penh = \frac{\text{pico de fluxo expiratório}}{\text{pico de fluxo inspiratório}} X \frac{\text{tempo expiratório}}{(\text{tempo de relaxamento} - 1)}$$

3.3 O modelo experimental

Camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA são capazes de reproduzir aspectos relevantes da SDRA associada à malária humana, tais como dano do parênquima

pulmonar, edema alveolar e intersticial, bem como hemorragias pulmonares, hipoxemia, efusão pleural e opacidade torácica observada ao exame radiológico (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; ORTOLAN *et al.*, 2014).

Para analisar componentes moleculares, como a HO-1, no desenvolvimento da SDRA associada à malária foi necessário obter amostras dos pulmões e do soro de animais antes do aparecimento dos primeiros sinais da síndrome.

Sendo assim, foi necessário usar um modelo preditivo previamente descrito (ORTOLAN *et al.*, 2014), no qual 2 grupos infectados foram utilizados: um grupo de sobrevivência para confirmar quais animais desenvolveriam ou não a SDRA e outro grupo onde os animais foram eutanasiados ao 7º dia após a infecção (DAI). Esse modelo preditivo é baseado nos parâmetros respiratórios Penh e frequência respiratória e na parasitemia do grupo destinado à sobrevivência (grupo controle), no qual se tem a certeza qual foi a causa de morte (SDRA ou hiperparasitemia - HP) ao final do experimento. Os animais do grupo controle que desenvolvem SDRA vêm a óbito entre os dias 7 e 12 após infecção, apresentando efusão pleural e pulmões hemorrágicos ao exame necroscópico. Os animais que morrem de HP (a partir do 13º DAI, mas a maioria por volta de 21º DAI) não apresentam efusão pleural e os pulmões estão de róseo claro a acinzentados. Portanto, o padrão-ouro para um animal ser considerado positivo no teste preditivo é a presença da efusão pleural e o aspecto macroscópico dos pulmões. Os valores dos parâmetros respiratórios (Penh e frequência respiratória) e da parasitemia dos animais do grupo de sobrevivência, obtidos ao 7º DAI, determinaram os pontos de corte (*cut off*), valendo-se de curvas ROC ("*Receiver Operating Characteristic*"), em cada experimento individualmente. Os valores dos pontos de corte foram aplicados nos valores dos parâmetros respiratórios e parasitemia medidos ao 7º DAI, antes da eutanásia destes animais e assim, estes foram classificados em dois grupos (SDRA e HP) **(Figura 6)**.

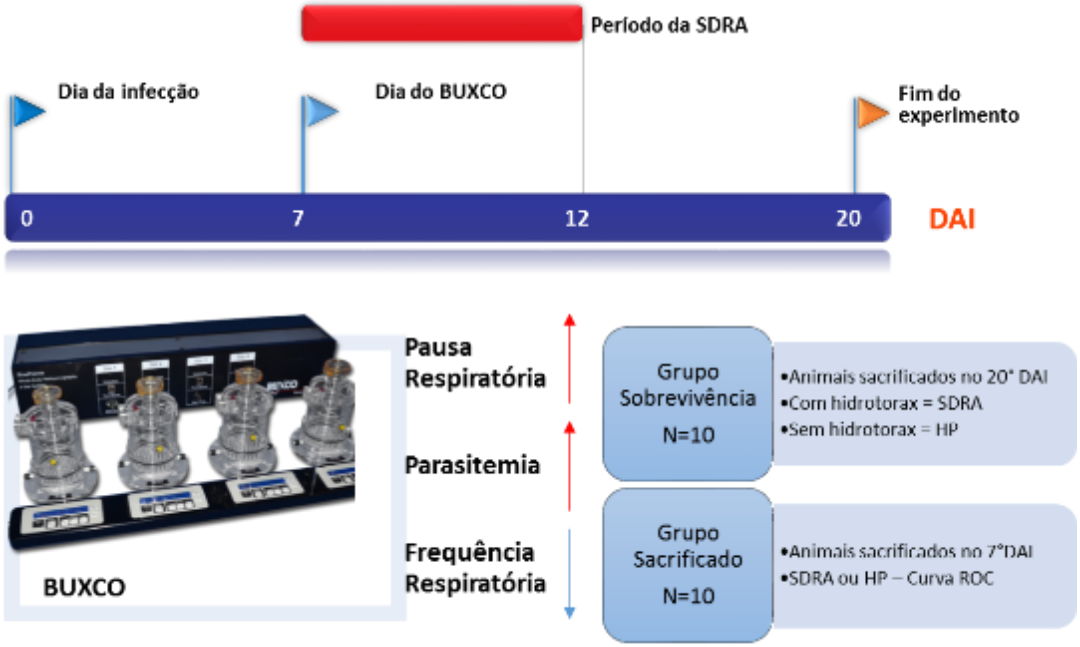


Figura 6 - Método de predição de SDRA ou HP em DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. No grupo eutanásia, os animais são sempre eutanasiados no 7º dia pós infecção (DAI), sendo que os seus órgãos/sangue total são coletados e usados dependendo do objetivo do experimento. Os animais do grupo de animais eutanasiados são classificados como SDRA ou HP por meio de parâmetros respiratórios medidos em câmaras pletismográficas (BUXCO) e pela parasitemia com base em curvas ROCs destes parâmetros dos animais do grupo de sobrevivência. A causa de morte dos animais do grupo de sobrevivência é determinada, através de necropsia, pela presença ou não de efusão pleural, como SDRA ou HP, respectivamente.

3.4 Histologia

A necropsia foi realizada em camundongos que morreram da infecção por malária ou que foram eutanasiados no 20º DAI para completar a experiência e evitar o sofrimento dos animais. Os pulmões foram coletados, fixados em formalina tamponada (10%) durante 24 hs e, em seguida, embebidas em parafina, seccionadas a 5 µm em lâminas e coradas com hematoxilina-eosina (HE). A presença de hemozoína no tecido foi quantificada por microscopia de luz polarizada (**Figura 13**). Todas as imagens de microscopia deste trabalho foram adquiridas no microscópio AXIO Imager M2 (Zeiss) usando o Axio Cam HRc (Zeiss) e o software Axio Vision, versão 4.9.1.0.

A fim de determinar a percentagem de área alveolar, 20 imagens de microscopia por corte de pulmão corado com HE foram adquiridas e foi utilizado o software Gimp, versão 2.8.16 (https://www.gimp.org) para determinar a área alveolar em pixels de cada imagem. A percentagem de área alveolar relativamente à área total das imagens foi determinada para camundongos SDRA, HP, tratados com hemina e não tratados (controle).

3.5 Imuno-histoquímica da HO-1

A imuno-histoquímica para detecção da HO-1 foi realizada em cortes do tecido pulmonar de camundongos DBA/2. Os animais foram eutanasiados e os seus pulmões perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo, com PBS (*phosphate-buffered saline*) 1 x e fixados com formol 10% durante 24 hs e, em seguida, em etanol 70%. Foram realizados cortes parafinados com 5 µm de espessura nos quais se procedeu à realização da imuno-histoquímica. Primeiramente, as lâminas contendo os cortes de tecido foram colocadas na estufa de 60 °C, por 20 minutos. Em seguida as mesmas foram passadas em solução de xilol duas vezes, por 15 minutos a 60 °C. As lâminas foram então passadas em álcool absoluto (2 vezes), uma vez por álcool 95%; uma vez por álcool 70%; uma vez por água destilada e, finalmente, por PBS 1 x de pH 7,2 a 7,4 (1 minuto cada vez).

Em seguida, procedeu-se à recuperação antigênica com tampão citrato de sódio pH 6, por 45 minutos a 95 °C. As mesmas foram então lavadas com água e o pH foi equilibrado em PBS 1 x. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 3%, por 2 vezes de 15 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida foi utilizado o *kit* REVEAL mouse/rabbit (SPRING – Cód. SPD-015), procedendo-se de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação da HO-1 no tecido pulmonar foi feita através do cálculo da área marcada pelo anticorpo em toda a secção do corte do tecido. O cálculo foi feito no software ImageJ, recorrendo ao *plugin* IHC toolbox (SHU; QIU; ILYAS, 2015), como mostra a **Figura 7**.

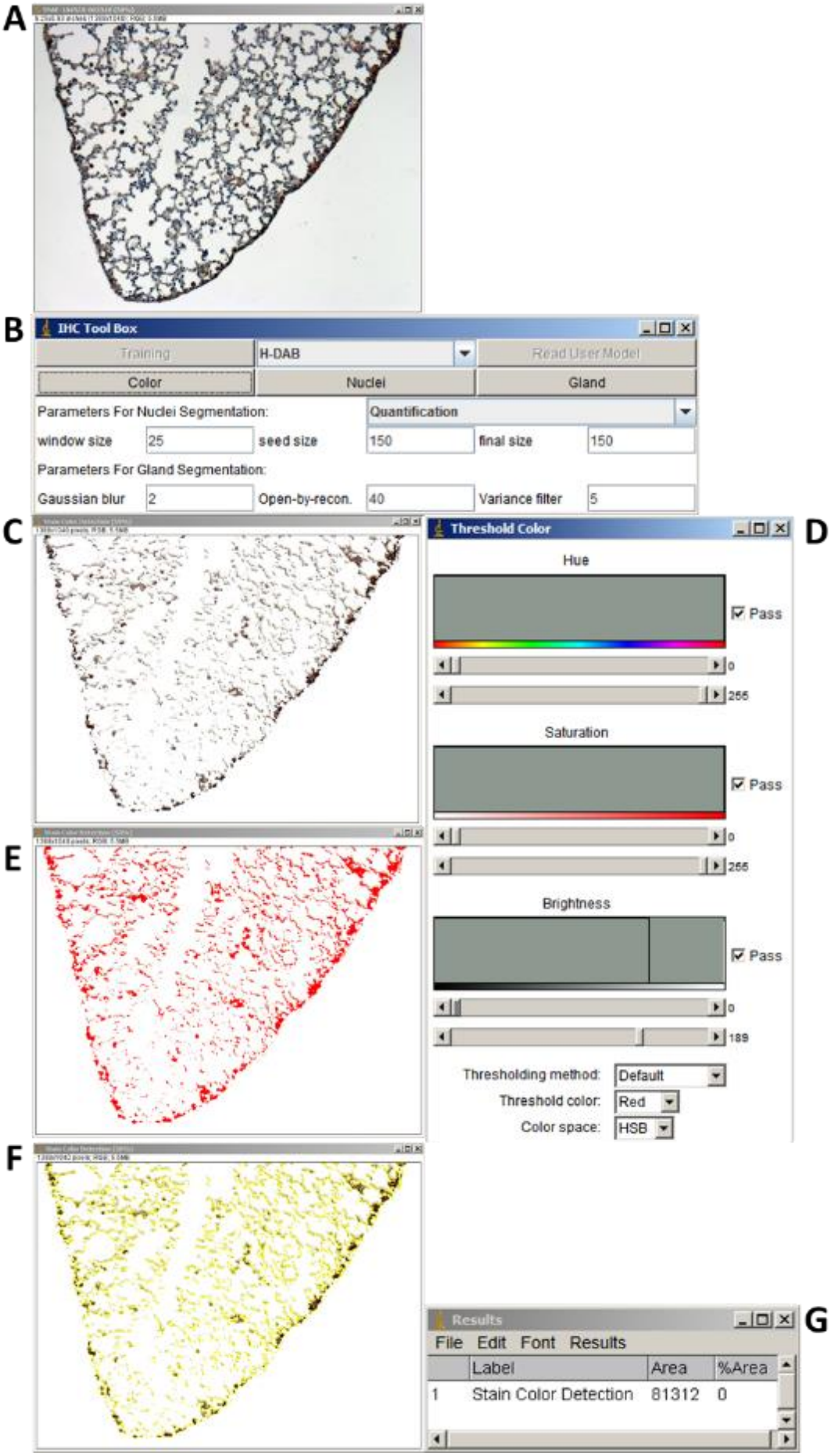

A
B
IHC Tool Box
Training
H-DAB
Read User Model
Color
Nuclei
Gland
Parameters For Nuclei Segmentation:
Quantification
window size
25
seed size
150
final size
150
Parameters For Gland Segmentation:
Gaussian blur
2
Open-by-recon.
40
Variance filter
5
C
D
Threshold Color
Hue
Pass
0
255
Saturation
Pass
0
255
Brightness
Pass
0
189
Thresholding method:
Default
Threshold color:
Red
Color space:
HSB
E
F
G
Results
File Edit Font Results
Label
Area
%Area
1
Stain Color Detection
81312
0

Figura 7 - Quantificação da área de tecido que expressa a HO-1, marcada por imuno-histoquímica. A partir da imagem original de microscopia óptica com luz transmitida (A) é utilizado o aplicativo *IHC toolbox* do software ImageJ (B) para selecionar as áreas de tecido marcadas por imuno-histoquímica (C). Com a ferramenta *treshold color* (D) seleciona-se o tecido marcado para determinação da área de superfície (E, F e G). O mesmo procedimento é feito na mesma imagem, sem o aplicativo *IHC toolbox*, de maneira a determinar a área de tecido total (marcada e não marcada por imuno-histoquímica). Por fim determina-se a percentagem de área de tecido que expressa HO-1.

3.6 Medição da expressão de HO-1 por western blot

Amostras congeladas de tecido pulmonar de camundongo foram sonicadas e homogeneizadas em gelo utilizando o tampão RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*) com inibidor de protease, elaborado de acordo com o protocolo geral de western blot da BioRad (*Bulletin* 6376). As amostras foram analisadas quanto ao teor de proteína utilizando um *kit* de dosagem de proteína total, (*Bradford protein assay* - BioRad), em conformidade com as instruções do fabricante. Cada amostra foi quantificada e em seguida pipetou-se 9 mg de proteína em cada poço de um gel de 12% de poliacrilamida, Tris-glicina SDS (*sodium dodecyl sulfate*), de acordo com o protocolo do fabricante. O gel foi transferido para uma membrana de PVDF (*polyvinylidene difluoride*) por eletroforese a 30 V durante 16 hs. A membrana foi bloqueada em PBS com 0,1% de Tween 20 (PBS-T), e 10% de leite desnatado à temperatura ambiente durante 2 hs. Todos os anticorpos foram diluídos no mesmo tampão (PBS-T) com 1% de leite desnatado.

A membrana foi então incubada com o anticorpo policlonal *rabbit anti mouse* HO-1 (1:20.000) durante 1 h à temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada cinco vezes com PBS-T e incubada com o anticorpo *goat anti rabbit* IgG conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) (1:20.000) durante 1 h à temperatura ambiente. Depois de se lavar cinco vezes com PBS-T, um sistema de ECL (*enhanced chemiluminescence*) - Clarity™ Western ECL Blotting Substrate da BioRad, foi utilizado para a detecção das proteínas. A expressão de HO-1 foi calculada pela densitometria das bandas de HO-1 no *immunoblot* em relação ao gene de *housekeeping* β-actina.

3.7 Reação da polimerase em cadeia com transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR)

Foi quantificada a expressão gênica de mRNA de *hmox* (HO-1) nos pulmões por qRT-PCR em camundongos infectados ou não. Os pulmões foram colhidos e imediatamente macerados em nitrogênio líquido, e posteriormente, foi adicionado 1 ml Trizol, sendo armazenados a -80 °C até o processamento. A extração de RNA foi realizada de acordo com o

protocolo “Animal Cell I” do *kit* de extração de RNA “RNEasy Mini” (Qiagen). A síntese de cDNA foi realizada com 1 µg de RNA da amostra, utilizando-se o *kit* “First Strand cDNA Synthesis” para RT-PCR (Roche) de acordo com as indicações do fabricante. Para a execução do qRT-PCR foi utilizado SyBr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os primers utilizados foram os seguintes: para a HO-1: 5’-TCTCAGGGGGTCAGGTC-3’ (forward) e 5’-GGAGCGGTGTCTGGGATG-3’ (reverse). Os resultados foram normalizados de acordo com a expressão do gene constitutivo HPRT (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*). Para o HPRT os primers usados foram: 5’-TGCTCGAGATGTGATGAAGG-3’ (forward) e 5’-TCCCCTGTTGACTGGTCATT-3’ (reverse). O método quantitativo para as análises foi o $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.8 Níveis de HO-1, VEGF e bilirrubina no soro de animais DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA

Os níveis séricos de HO-1 e VEGF foram mensurados pelo *kit* de ELISA ImmunoSet HO-1 da Enzo Life Sciences (catálogo número ADI-960-071) e pelo *kit* Quantikine ELISA mouse VEGF immunoassay da R&D (catálogo número MMV00), respectivamente, em camundongos infectados e não infectados, de acordo com as instruções do fabricante.

Para medir os níveis de bilirrubina no soro de camundongos, uma medida indireta da atividade da HO-1 (ARAUJO *et al.*, 2013), foi usado o *kit* de ELISA da BIOMATIK (EKU08395), seguindo as instruções do fabricante. Os valores de bilirrubina foram apresentados em microgramas por mililitro.

3.9 Análise da permeabilidade alvéolo-capilar

A permeabilidade microvascular pulmonar foi medida de acordo com o protocolo previamente descrito (ORTOLAN *et al.*, 2014). Resumidamente, no dia 7º DAI, os camundongos foram injetados com 0,2 mL de 1% de azul de Evans (Sigma), por via intravenosa. Os camundongos foram eutanasiados 45 minutos depois, e os pulmões foram pesados e colocados em 2 mL de formamida (Merck) durante 48 hs a 37 °C. A absorvância da formamida foi então medida a λ620 nm. A quantidade de azul de Evans por grama de tecido de pulmão foi calculada a partir de uma curva padrão. A permeabilidade do pulmão de camundongos tratados com hemina e camundongos tratados com solução salina foi expressa em relação à permeabilidade do pulmão dos camundongos não infectados.

3.10 Medição dos níveis de citocinas

Os níveis de citocinas foram medidos em duplicata a partir do soro e do lisado do pulmão dos camundongos DBA/2. Para isso foi usado o *kit* CBA Inflammation (Cytometric Bead Array, Becton-Dickinson, San José, CA, EUA) para as citocinas de camundongo IL-12 p70, TNF-α, IFN-γ, MCP-1, IL-10 e IL-6. Este *kit* foi usado para a estimativa de citocinas utilizando citometria de fluxo (FACS Calibur sistema BD, Becton-Dickinson, e o programa Cell Quest Software Pro, versão 5.2). O intervalo da curva padrão para uma determinada citocina foi determinado de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram analisados utilizando FlowJo, versão 10.0.7.

3.11 Modulação da HO-1

A HO-1 foi modulada pelos seguintes tratamentos: a hemina como indutor e o zinco protoporfirina IX (ZnPPIX) como inibidor da HO-1. A hemina foi administrada por via intraperitoneal (IP) dois dias antes da infecção e no 4º DAI com a dose de 17 mg/kg. A ZnPPIX foi administrada por via IP no 6º DAI com a dose de 10 mg/kg. Em outro experimento a ZnPPIX foi administrada diariamente (começando 2 dias antes da infecção e continuando por 7 dias após a infecção), por via intraperitoneal na dose de 5 mg/Kg por dia, conforme demonstra a **Figura 8**.

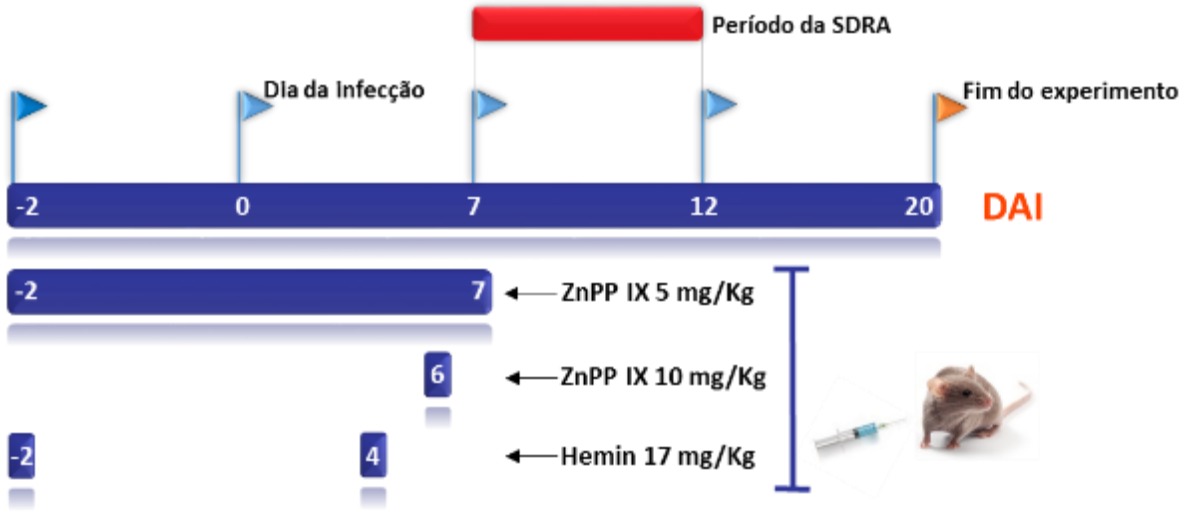


Figura 8 – **Esquema de administração de moduladores da HO-1.** Abreviaturas: ZnPPIX - zinco protoporfirina IX; DAI – dia após infecção.

3.12 Isolamento das células endoteliais pulmonares

As células endoteliais de pulmão foram obtidas de camundongos DBA/2, de acordo com o que está descrito numa publicação prévia (CHEN, S F; FEI; LI, 1995). Resumidamente, após a eutanásia, o corpo do animal foi lavado com desinfetante à base de álcool iodado. Em seguida todo o sangue foi removido por meio de corte da artéria carótida. Na câmara de fluxo laminar, o tecido de pulmão foi cortado em fragmentos de aproximadamente 1 mm², plaqueados em placas de 6 poços de poliestireno com meio de cultura DMEM suplementado com 20% de soro fetal de bovino (SFB) e antibióticos, em cada poço. A placa foi então incubada a 37 °C com atmosfera de 5% de CO_2 durante 72 h. Após este período, os fragmentos de tecido foram removidos e 50% do meio foi substituído. Após 7 dias de incubação, as células foram removidas com tripsina a 0,25% durante 15 min e depositadas em um frasco de cultura de 75 cm^2 ou 150 cm^2, dependendo da quantidade de células. O procedimento de tripsinização foi repetido a cada 5 a 7 dias. Finalmente, as células foram cultivadas durante 15 a 20 dias, até serem utilizadas nos ensaios seguintes.

As células endoteliais de pulmão isoladas foram caracterizadas por imunofluorescência com os anticorpos: anti-VWF, anti-VCAM, anti-ACE, anti-CD62E, anti-eNOS, anti-CD31 e anti-VE-caderina.

3.13 Imunofluorescência de microfilamentos de actina

Os filamentos de actina de células endoteliais do pulmão de DBA/2 foram marcados com faloidina Texas Red (Life Technologies). Para isso, estas células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços, aderidas à gelatina em lamínulas de vidro e mantidas a 37 °C. As células foram estimuladas com extrato de *P. berghei* ANKA, durante 3 hs, após incubação com hemina (5, 10 e 20 µM, durante 24 hs) ou apenas com meio de cultura DMEM suplementado com 20% de SFB. Subsequentemente, as células foram lavadas com PBS pré-aquecido a 1%, fixadas com 3,7% de formaldeído e permeabilizadas com acetona (-20 °C). Em seguida, as células endoteliais foram bloqueadas com uma solução de albumina de soro bovino (BSA a 1%). Actina foi marcada por 20 minutos de incubação com Texas Red. Os núcleos das células foram marcados posteriormente com Hoechst (H33342, Life Technologies). As lâminas de microscopia foram montadas com meio aquoso de montagem Fluoromount (Sigma). As imagens foram analisadas por microscopia de fluorescência no microscópio AXIO Imager M2 (Zeiss).

3.14 Análise morfométrica de espaços intercelulares

As diferentes concentrações de hemina, na presença ou não do extrato de *P. berghei* ANKA, foram testadas em triplicata (6 x 10^4 células por lamínula). Dez a vinte fotos foram capturadas em cada lamínula com a objetiva de 40 x. Foram selecionados campos com células justapostas, completamente confluentes. A fim de evitar a repetição das imagens capturadas, a lamínula foi fotografada em "zig-zag" a partir do topo para baixo. A área de espaços intercelulares (aberturas das junções “gaps”) foram circuladas através da ferramenta “seleção contígua” do programa Gimp 2.8.16 (https://www.gimp.org/). A razão entre a área total das “gaps” e a área total de cada imagem foi calculada e expressa em percentagem total de Gaps formados, em cada imagem. A metodologia aplicada está exemplificada na **Figura 9**.

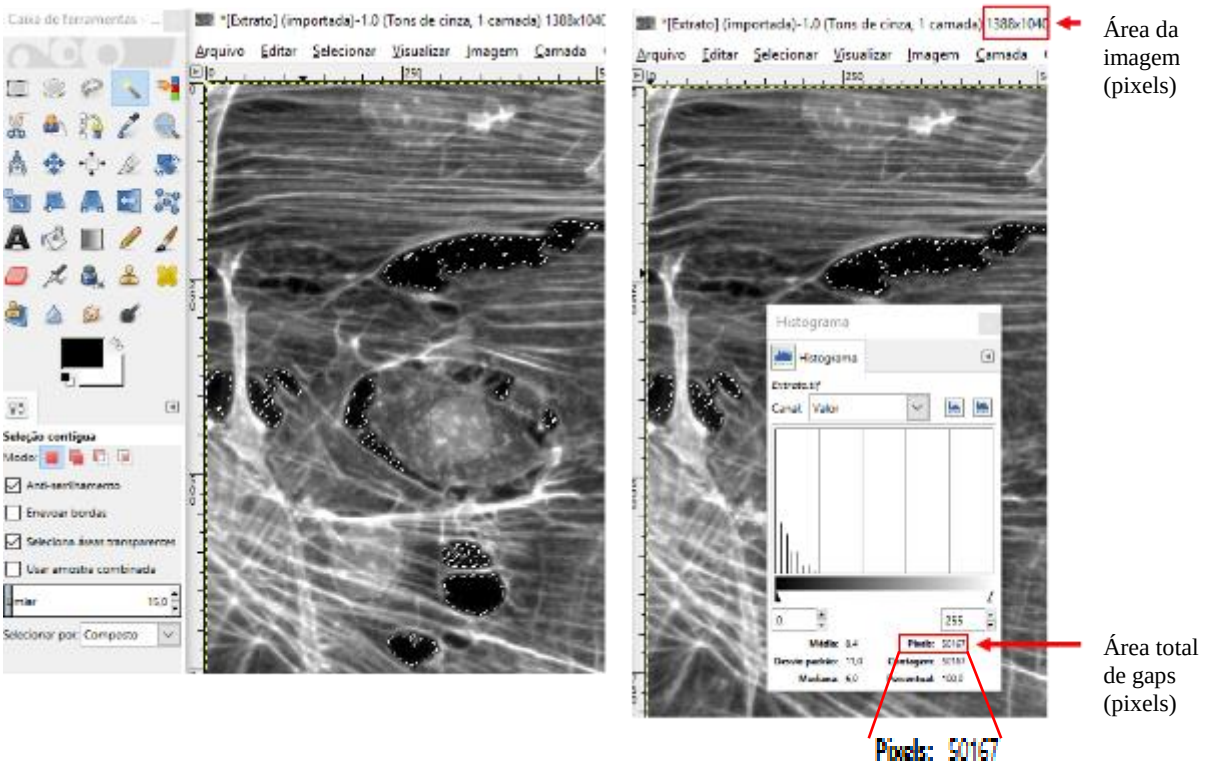


Figura 9 – Análise morfométrica de espaços intercelulares.

3.15 Medida da permeabilidade em células endoteliais primárias de pulmão

A permeabilidade foi analisada em células endoteliais pulmonares plaqueadas em insertos de membranas permeáveis, com poros de 0,4 µm (TRANSWELL® Corning), pré-tratadas com gelatina e acopladas em placas de 24 poços, de poliestireno, a uma concentração de 2,2 x 10^4 células por poço e mantidas em cultura DMEM a 37 °C. Depois de 96 hs, quando

as células atingiram a confluência, o extrato de *P. berghei* ANKA foi aplicado durante 3 hs, após a incubação com hemina (20 µM durante 24 hs) ou apenas com meio de cultura DMEM suplementado com 20% de SFB. Subsequentemente, o meio de cultura foi substituído pela solução balanceada de Hank e no compartimento superior de cada inserto (em contato com as células), foram adicionados 200 mL de azul de Evans a uma concentração de 2 mg/mL a 37 °C. Após 30 minutos, o líquido do compartimento inferior de cada amostra foi coletado e analisado em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Finalmente, a concentração de azul de Evans foi determinada em cada amostra a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de azul de Evans (de 0,2 mg/mL a 0,0031 mg/mL). Um esquema da TRANSWELL® é apresentado na **Figura 10**.

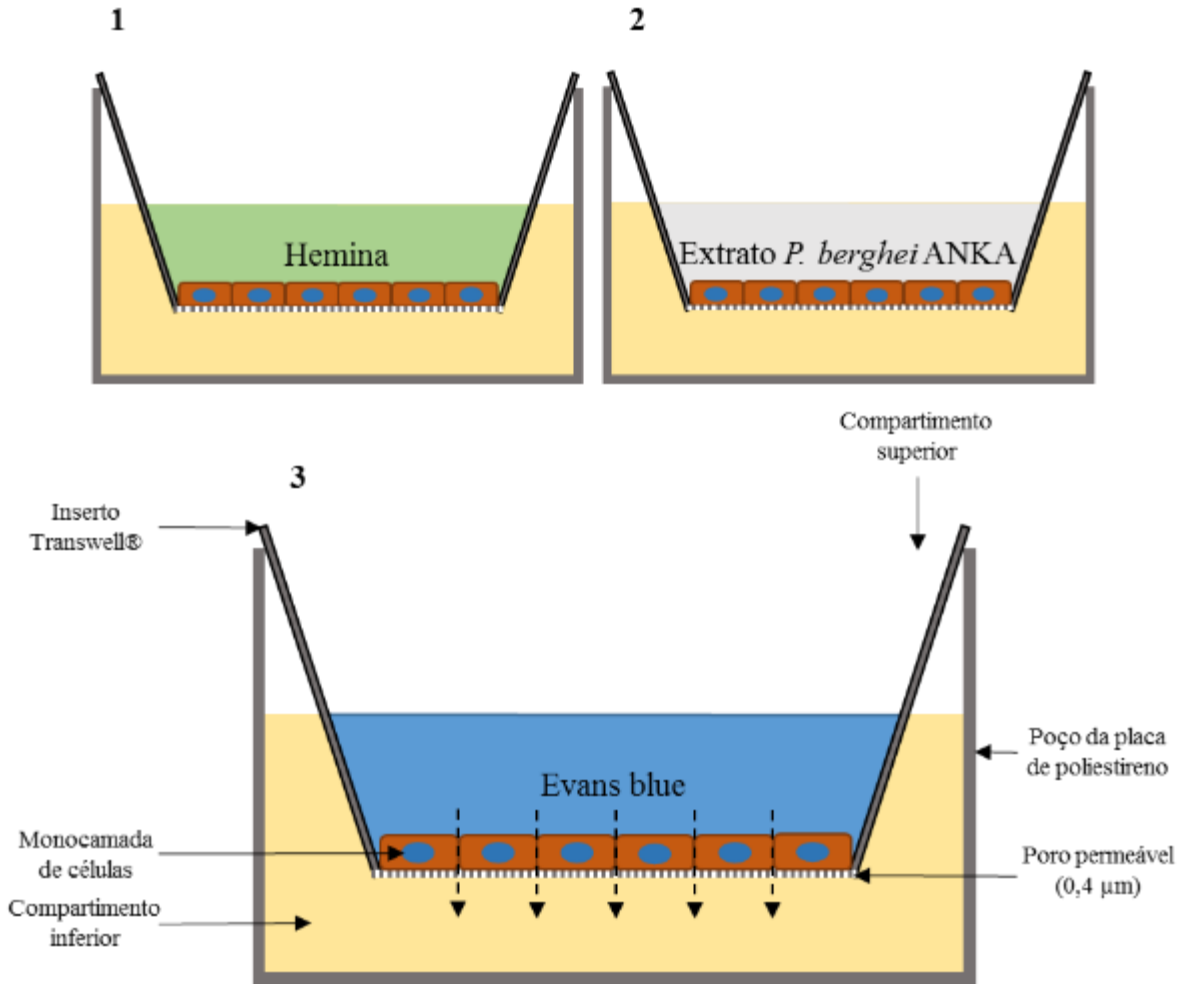


Figura 10 – Representação do ensaio de permeabilidade endotelial vascular. As células endoteliais pulmonares foram cultivadas na membrana constituída por poros permeáveis do inserto. As células foram tratadas ou não com hemina (20 µM) (1) e estimuladas com extrato de *P. berghei* ANKA (2). A quantificação do azul de Evans, que atravessou os poros permeáveis para o compartimento inferior (3), foi realizada por espectrofotometria, a 650 nm.

3.16 Quantificação da morte celular

Para a quantificação da morte celular nas células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2, as culturas submetidas aos tratamentos com hemina (5, 10 e 20 µM, durante 24 hs) e com o extrato do parasita (3 hs) foram marcadas pelo método de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), seguindo as instruções do *kit* (ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit - Merck Millipore). A quantificação da apoptose foi realizada por contagem de células marcadas em relação ao número total de células em cada imagem de microscopia ótica de luz transmitida. Foram capturadas 40 imagens com a objetiva de 20 x para esta análise.

3.17 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Os testes T não pareado e ANOVA de um fator com o teste de Bonferroni foram usados para variáveis paramétricas. As variáveis não-paramétricas foram analisadas pelo teste de Mann Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0 (http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/), incluindo as avaliações de sensibilidade e especificidade. As curvas ROC foram geradas usando o programa MedCalc, versão 8.2.1.0 (https://www.medcalc.org/). As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste Log-rank. Nos testes estatísticos foi considerado o valor de p igual ou inferior a 0,05 para significância estatística. Os dados apresentados em gráficos representam a média e o erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 A infecção de camundongos DBA/2 com 10^6 eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA leva ao desenvolvimento de SDRA entre o 7º e o 12º DAI

Tal como esquematizado na **Figura 11A**, os animais vêm a óbito entre o 7º e o 12º DAI. Durante este período a parasitemia está em torno de 20% (**Figura 11B**) e os animais apresentam os seguintes sinais na necropsia: pulmões congestos e hemorrágicos e efusão pleural, sinais típicos da SDRA (**Figura 11C**). Os camundongos que sobrevivem após o 12º DAI acabam por morrer até ao 20º DAI, ou são eutanasiados neste dia, e não apresentam efusão pleural na necropsia, mas sim, pulmões de tonalidade acinzentada e esplenomegalia (**Figura 11C**). Estes animais morrem de hiperparasitemia (HP) e anemia grave.

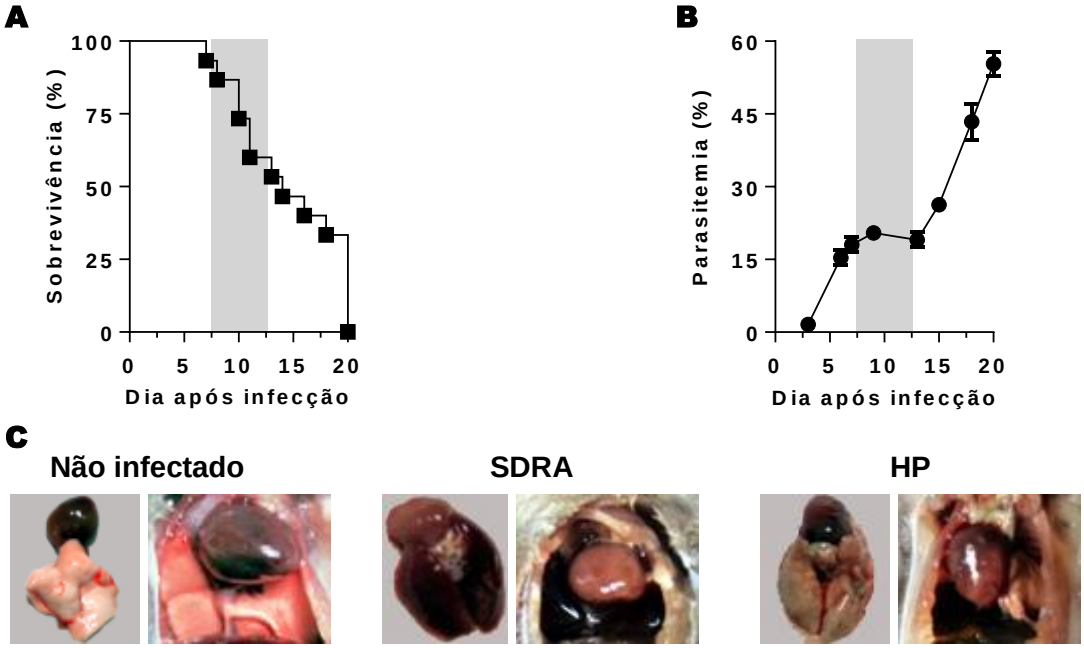
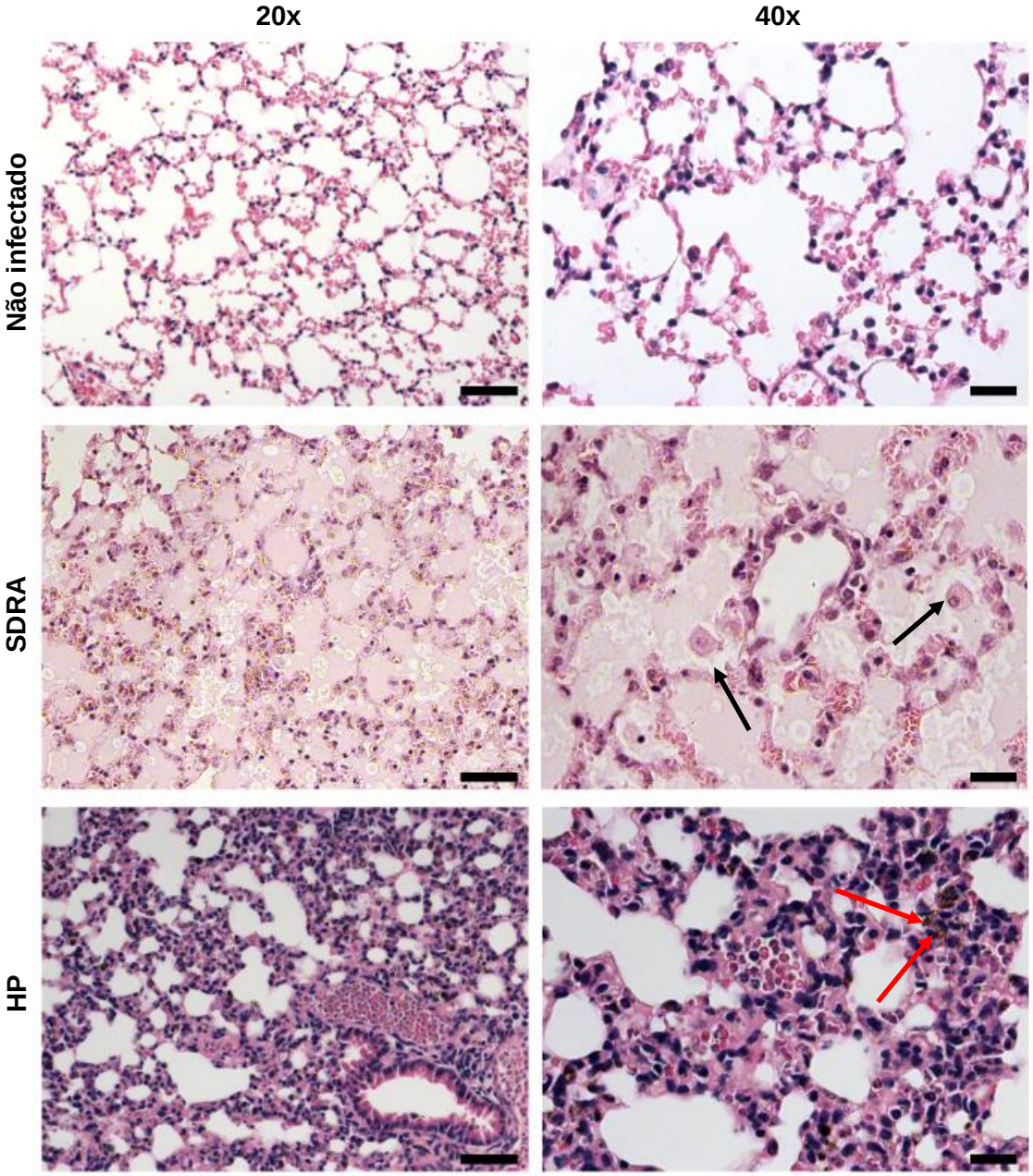


Figura 11 - Camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA apresentam dois fenótipos diferentes. Curva de sobrevivência (A), percentagens de parasitemia (B) e imagens representativas de necropsias de animais não infectados, SDRA e HP (C). Os dados desta figura resultam de um ensaio com 10 animais DBA/2 infectados com 10^6 parasitas de *P. berghei* ANKA.

4.2 DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA que desenvolvem SDRA apresentam edema alveolar, hemorragias alveolares, infiltrado inflamatório e menor área alveolar

Camundongos que morrem de SDRA apresentam sinais característicos no tecido pulmonar, tal como se pode observar na **Figura 12**, onde estão representados cortes do tecido pulmonar de camundongos corados com hematoxilina-eosina. Os achados histopatológicos de SDRA no tecido pulmonar são: a presença de edema alveolar grave, a presença de hemorragias alveolares e congestão e a presença de infiltrado inflamatório e lesão da parede alveolar. Os animais HP não apresentam os sinais antes referidos, em vez disso apresentam um quadro de pneumonia intersticial crônica mais tardiamente. Nestes animais é ainda

possível observar grande quantidade de cristais de hemozoína (**Figura 12A**) e uma redução significativa da área alveolar (**Figura 12B**).


20x
40x
Não infectado
SDRA
HP

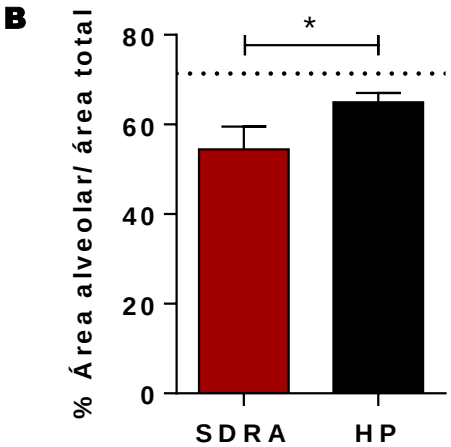

B
% Área alveolar/ área total
80
60
40
20
0
*
SDRA
HP

Figura 12 – Camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA que morrem de SDRA apresentam histopatologia pulmonar característica. (A) Cortes histológicos de pulmão corados com hematoxilina-eosina. SDRA– Camundongo infectado, que veio a óbito no 9º DAI, com SDRA. As setas apontam para macrófagos alveolares espumosos. HP – Camundongo infectado, que veio a óbito no 20º DAI, com HP e que apresenta pneumonia intersticial crônica. As setas apontam para o pigmento malárico (hemozoína). 20x e 40x indicam a ampliação das imagens. Barras de escala: em 20x, 50 µm; em 40x, 20 µm. (B) Percentagem de área alveolar em animais SDRA e HP eutanaziados ao 7º DAI. (teste de Mann-Whitney, n= 12, p*≤0,05).

4.3 Os níveis de hemozoína são maiores no pulmão de camundongos DBA/2 infectados que apresentam edema alveolar

Camundongos classificados como SDRA e que apresentam edema alveolar ao 7º DAI têm maiores níveis de hemozoína no pulmão **(Figura 13)**. Não existe diferença significativa entre animais SDRA e HP **(Figura 13B)**, no entanto nos animais com edema alveolar os níveis de hemozoína são superiores **(Figuras 13C)**.

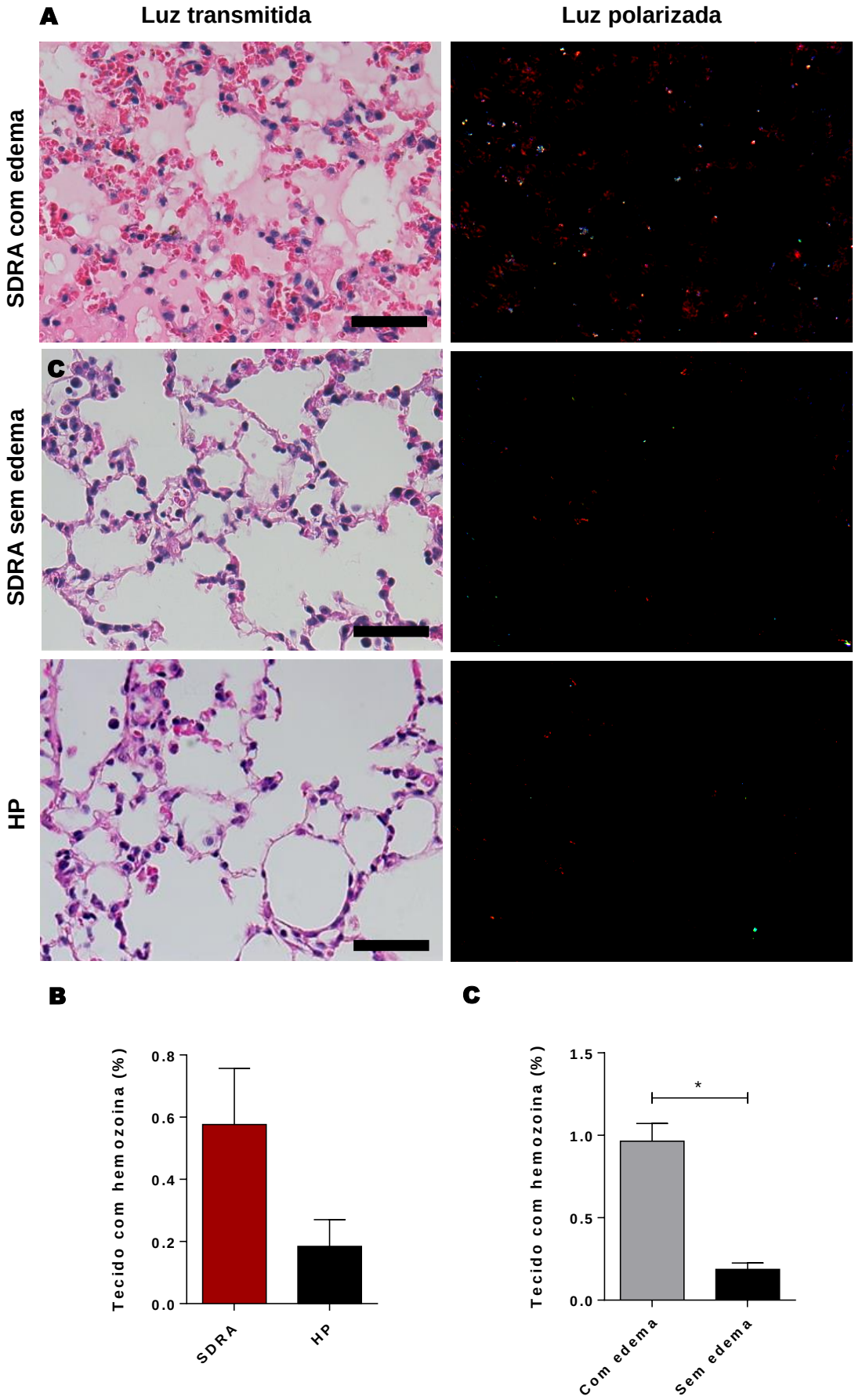

A
Luz transmitida
Luz polarizada
SDRA com edema
SDRA sem edema
HP
C
B
Tecido com hemozoina (%)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
SDRA
HP
C
Tecido com hemozoina (%)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Com edema
Sem edema

Figura 13 - Quantificação da hemozoína em cortes histológicos de pulmão corados com hematoxilina-eosina, por microscopia com luz polarizada. (A) SDRA com edema – camundongo SDRA com edema. SDRA sem edema – camundongo SDRA sem edema. HP – camundongo HP. Ampliação de 40x. Barras de escala: 50 µm. (B) Percentagem de tecido com hemozoína em animais SDRA e HP (teste de Mann-Whitney, n=9, p=0,4). (C) Percentagem de tecido com hemozoína em 3 animais com edema e em 6 sem edema (teste de Mann-Whitney, n=9, p*≤0,05).

4.4 A expressão da HO-1 é maior em pulmões de animais desenvolvem SDRA do que em animais que desenvolvem HP

Para observar a expressão proteica de HO-1 ao nível dos pulmões foram realizadas imuno-histoquímicas em cortes do tecido pulmonar de camundongos. Tal como mostra o gráfico da **Figura 14**, a expressão da HO-1 é significativamente superior em camundongos classificados como SDRA, em relação a camundongos classificados como HP.

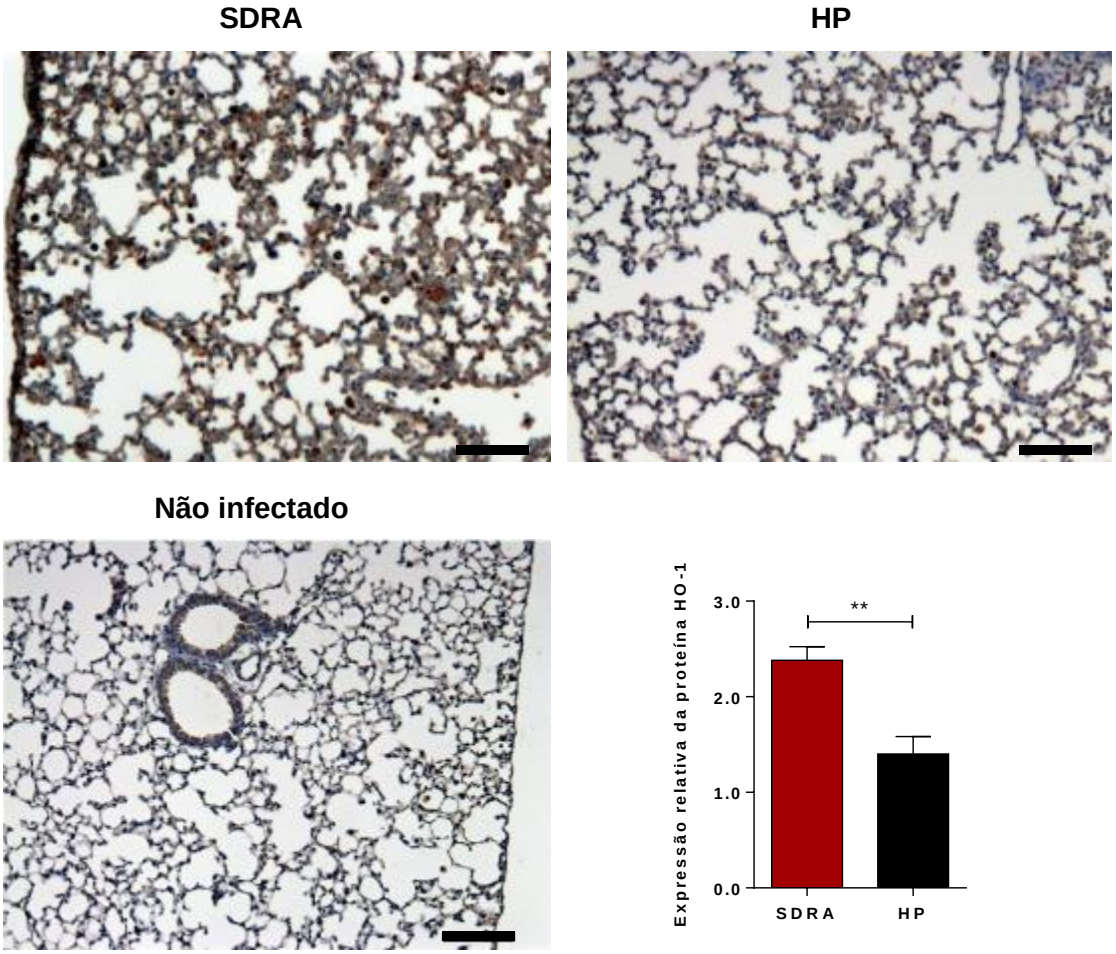


Figura 14 - A expressão da proteína HO-1 é superior no tecido pulmonar de animais que desenvolvem SDRA. Imagens representativas de cortes de pulmão submetidos a imuno-histoquímica para detecção da proteína HO-1 (marrom) e contra-corados com hematoxilina-eosina para evidenciar os núcleos das células (azul). A ampliação é de 10x (barra de escala com 100 µm). Os animais foram eutanasiados ao 7º DAI. O gráfico representa a quantificação da expressão da proteína de HO-1 por imuno-histoquímica (teste de Mann-Whitney test, n=10, p**≤ 0,01). Os dados do gráfico são expressos relativamente aos valores médios do grupo de animais não infectados (*fold increase*).

Como forma de se confirmar que a expressão da HO-1 está aumentada em animais que desenvolvem SDRA, foram realizados ensaios de *real-time PCR* e *western blot* do pulmão de animais infectados, bem como ensaios de ELISA do soro dos mesmos animais (**Figura 15**).

Os níveis da HO-1 estão aumentados no pulmão (mRNA) e no soro (proteína) de animais SDRA ao 7º DAI, em relação aos animais HP (**Fig. 15A** e **15B**). O mesmo se sucede com a proteína HO-1 nos pulmões de animais SDRA, o que está representado na **Figura 15** por *western blot* (**Figura 15C-E**) e por ELISA do lisado de tecido pulmonar (**Figura 15F**).

Uma medição indireta da atividade de HO-1 foi realizada através de um ensaio ELISA para bilirrubina em camundongos infectados e não infectados. Os níveis de bilirrubina são significativamente maiores em camundongos SDRA do que em camundongos não infectados (**Figura 15G**). No entanto, os níveis de bilirrubina não são significativamente diferentes entre camundongos SDRA e HP.

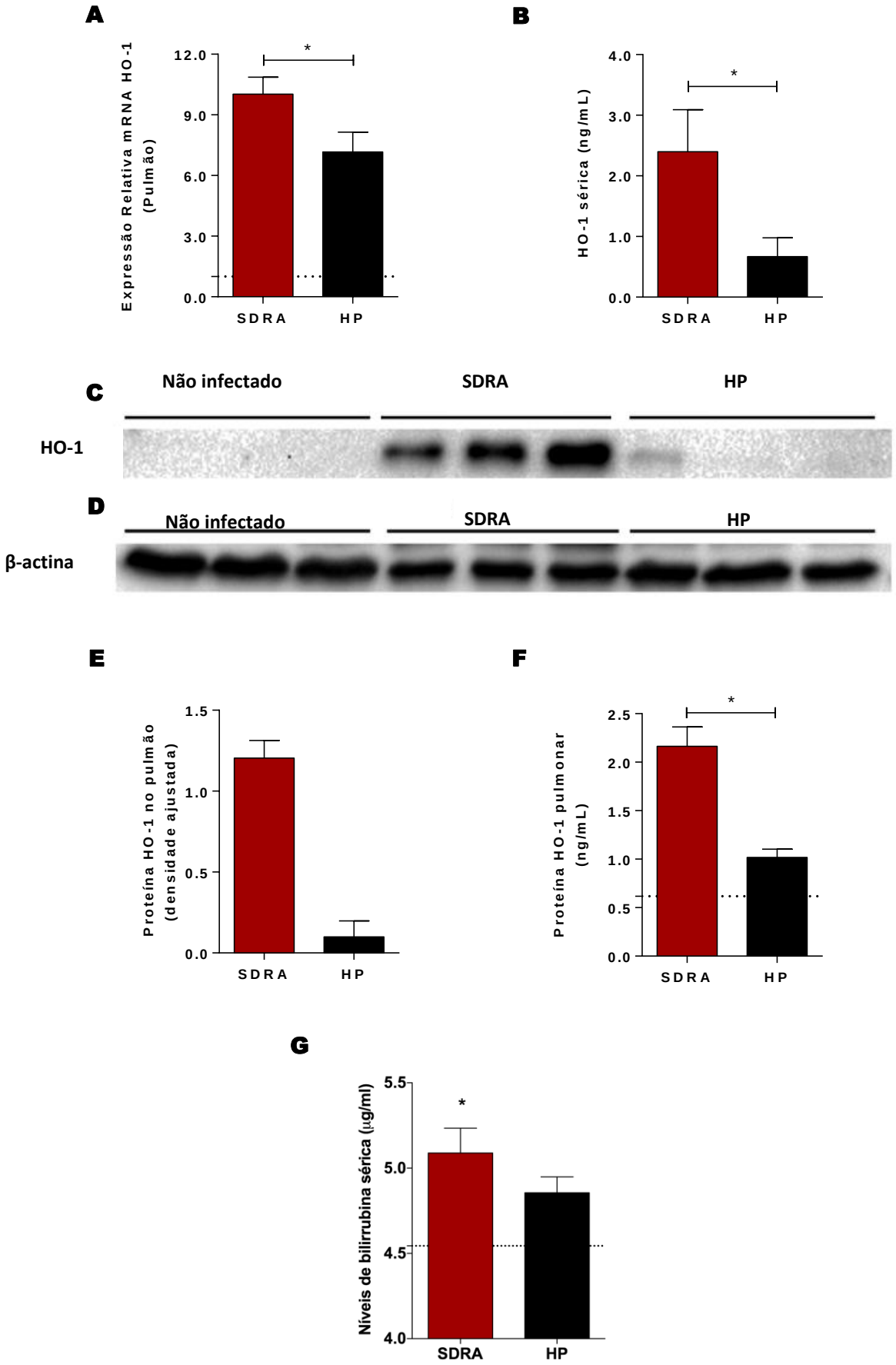

A
Expressão Relativa mRNA HO-1 (Pulmão)
12.0
9.0
6.0
3.0
0.0
*
SDRA
HP
B
HO-1 sérica (ng/mL)
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
*
SDRA
HP
C
Não infectado
SDRA
HP
HO-1
D
Não infectado
SDRA
HP
β-actina
E
Proteína HO-1 no pulmão (densidade ajustada)
1.5
1.0
0.5
0.0
SDRA
HP
F
Proteína HO-1 pulmonar (ng/mL)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
SDRA
HP
G
Níveis de bilirrubina sérica (µg/ml)
5.5
5.0
4.5
4.0
*
SDRA
HP

Figura 15 - A expressão da HO-1 é superior em pulmões de animais que desenvolvem SDRA. (A) Níveis de mRNA de HO-1 no pulmão de animais infectados relativamente a animais não infectados (teste T não pareado, n=28, p*≤0,05). (B) Níveis de proteína HO-1 no soro de animais SDRA e HP (teste de Mann-Whitney, n=9, p*≤ 0,05). (C, D e E) Níveis de proteína no pulmão determinados por *western blot* e representados por imunoblots da HO-1 (C) e da beta actina (D), a partir dos quais se determinou a expressão relativa da proteína HO-1 no pulmão através de densitometria das bandas do imunoblot em SDRA e HP em relação a animais não infectados (E). O lisado dos pulmões usado para fazer o western blot em C e D, foi também utilizado para quantificar a HO-1 através de ELISA (HO-1 não detectada em animais não infectados) (teste de Mann-Whitney, n=8, p*≤0,05) (F). (G) Níveis de bilirrubina no soro de animais não infectados (5 animais, cujo valor médio da bilirrubina está representado a tracejado) e infectados (teste de ANOVA de uma via com teste Bonferroni, n=38, p*≤0,05).

4.5 O tratamento com hemina aumenta a sobrevivência de DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA, protegendo-os da SDRA

Inicialmente, verificou-se se a hemina realmente aumenta a HO-1 nos pulmões, quando administrada por via intra-peritoneal. Para tal, realizou-se um tratamento de camundongos não infectados com 17 mg/Kg/dia de hemina, em dois dias, intervalados por 6 dias, que levou a um aumento expressivo do mRNA da HO-1 nos pulmões e da proteína no soro (**Figura 16A e 16B**).

Subsequente, camundongos foram tratados com 17 mg/Kg de hemina, 2 dias antes da infecção e ao 4º DAI. A maioria dos camundongos sobrevive até depois do 12º DAI, sem desenvolver SDRA, tal como mostra a **Figura 16C**. É também observado que a parasitemia é significativamente diferente no 5º e 7º DAI (**Figura 16D**). Em relação aos parâmetros respiratórios, o tratamento com hemina leva a uma redução significativa do Penh e a um aumento significativo da frequência respiratória, no 7º DAI (**Figuras 16E e 16F**).

Adicionalmente, verificou-se que os camundongos tratados com hemina apresentam uma área alveolar próxima à de um animal não infectado e não possuem edema alveolar (**Figura 17**).

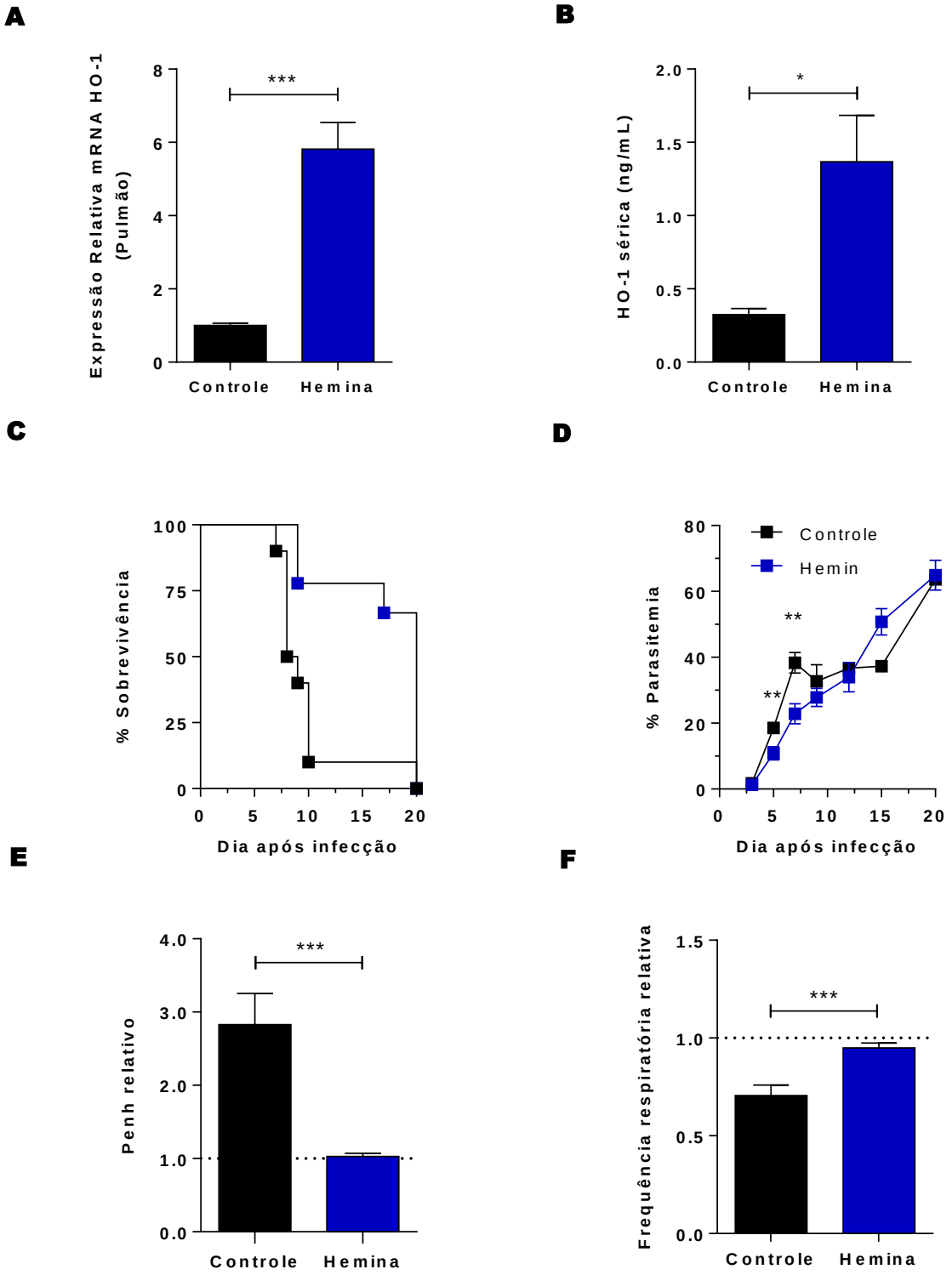


Figura 16 - O tratamento com hemina aumenta a sobrevivência dos animais infectados e melhora parâmetros os respiratórios. (A e B) Ensaios de real-time PCR de pulmão (teste T não pareado, n=10, p***≤0,001) e de ELISA do soro de camundongos não infectados tratados com hemina (17 mg/kg) e não tratados (teste de Mann-Whitney, n=9, p*≤0,05). (C) Gráfico de percentagens de sobrevivência (teste de log-rank, n= 19, p≤0,01). (D) Curvas de parasitemia (teste T não pareado, n=19, 5º DAI: p**≤ 0,01, 7º DAI: p**≤ 0,01). (E e F) Penh e frequência respiratória dos animais tratados e não tratados ao 7º DAI em relação aos valores médios de 6 animais não infectados (teste T não pareado, n=20, p ***≤0,001).

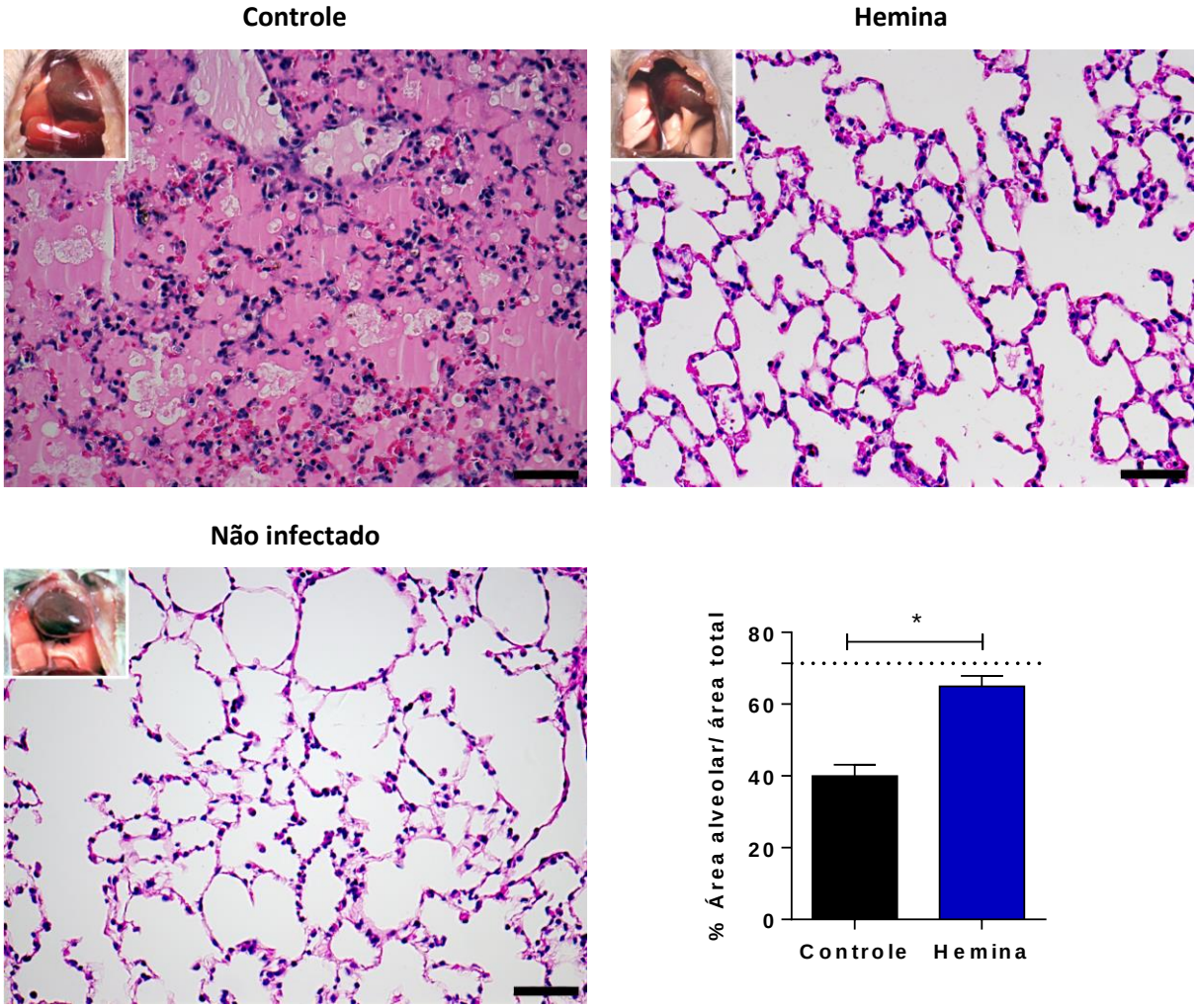


Figura 17 – Camundongos tratados com hemina não possuem edema alveolar e possuem maior área alveolar. Imagens representativas de necropsias e cortes histológicos de pulmão de de camundongos tratados com solução salina (em cima à esquerda), hemina (em cima à direita) e não infectados (em baixo). Os animais foram eutanaziados no 7º dia após a infecção. Escala: 50 μm. O gráfico representa a percentagem de área alveolar em camundongos tratados com hemina tratado e tratados com solução salina (teste de Mann-Whitney, n=8, p*≤0,05).

4.6 A hemina diminui os níveis de VEGF e a permeabilidade pulmonar em DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA

O tratamento com hemina (17mg/kg) leva a uma diminuição dos níveis de VEGF sérico em animais tratados (**Figura 18A**) e a uma redução dos níveis de permeabilidade pulmonar dos animais infectados ao 7º DAI, tal como mostra a **Figura 18B**. Pode verificar-se também que o tratamento com hemina leva a uma redução do mRNA de IFN-γ dos níveis proteicos de IFN-γ no soro e em lisados do tecido pulmonar, IL-10 no soro, MCP-1 no pulmão e no soro e de TNF-α no soro (**Figuras 18C a 18H**).

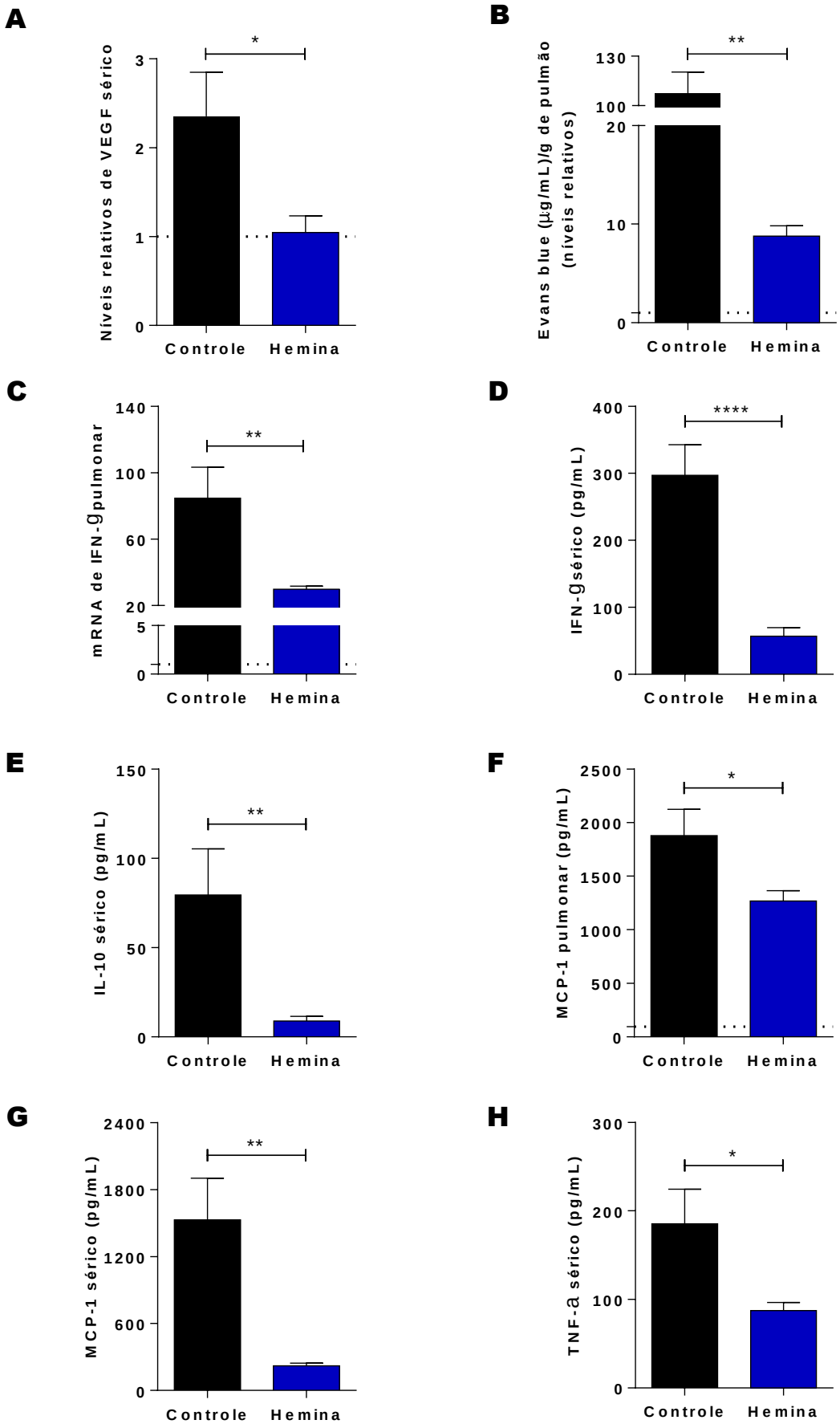

A
Níveis relativos de VEGF sérico
3
2
1
0
*
Controle
Hemina
B
Evans blue (µg/mL)/g de pulmão
(níveis relativos)
130
100
20
10
0
**
Controle
Hemina
C
mRNA de IFN-g pulmonar
140
100
60
20
5
0
**
Controle
Hemina
D
IFN-g sérico (pg/mL)
400
300
200
100
0
****
Controle
Hemina
E
IL-10 sérico (pg/mL)
150
100
50
0
**
Controle
Hemina
F
MCP-1 pulmonar (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
Controle
Hemina
G
MCP-1 sérico (pg/mL)
2400
1800
1200
600
0
**
Controle
Hemina
H
TNF-a sérico (pg/mL)
300
200
100
0
*
Controle
Hemina

Figura 18 - O tratamento com hemina diminui os níveis de VEGF sérico e a permeabilidade endotelial pulmonar em DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA. (A) Níveis de VEGF sérico determinados por ELISA (teste de Mann-Whitney, n=10, p*≤0,05). (B) Ensaio de permeabilidade endotelial pulmonar (teste de Mann-Whitney, n=10, p**≤0,01). A e B são relativos a dois experimentos independentes e os dados dos gráficos são expressos relativamente aos valores médios do grupo controle (*fold increase*). (C) Ensaio de real time PCR de IFN-γ no tecido de pulmão de camundongos (teste T não pareado, n =20, p**≤0.01). (D a H) Níveis das citocinas IFN-γ, IL-10, MCP-1, e TNF-α no soro e no pulmão determinados por CBA (teste T não pareado, n=20, p*≤0.05, p**≤0.01, p****≤0.0001). Em (A, B, C e F) a linha pontilhada corresponde ao valor médio de animais não infectados.

4.7 O ZnPPIX não tem efeito na sobrevivência e nos parâmetros respiratórios de DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA

Camundongos infectados e tratados com uma dose de 10 mg/Kg de ZnPPIX no 6º DAI, morrem com SDRA, não havendo diferenças tanto na sobrevivência, quanto na parasitemia (**Figura 19A e 19B**.). Em relação aos parâmetros respiratórios, também não se verifica qualquer alteração da frequência respiratória ou da Penh, tanto no 5º DAI como no 7º DAI (**Figura 19C e 19D**).

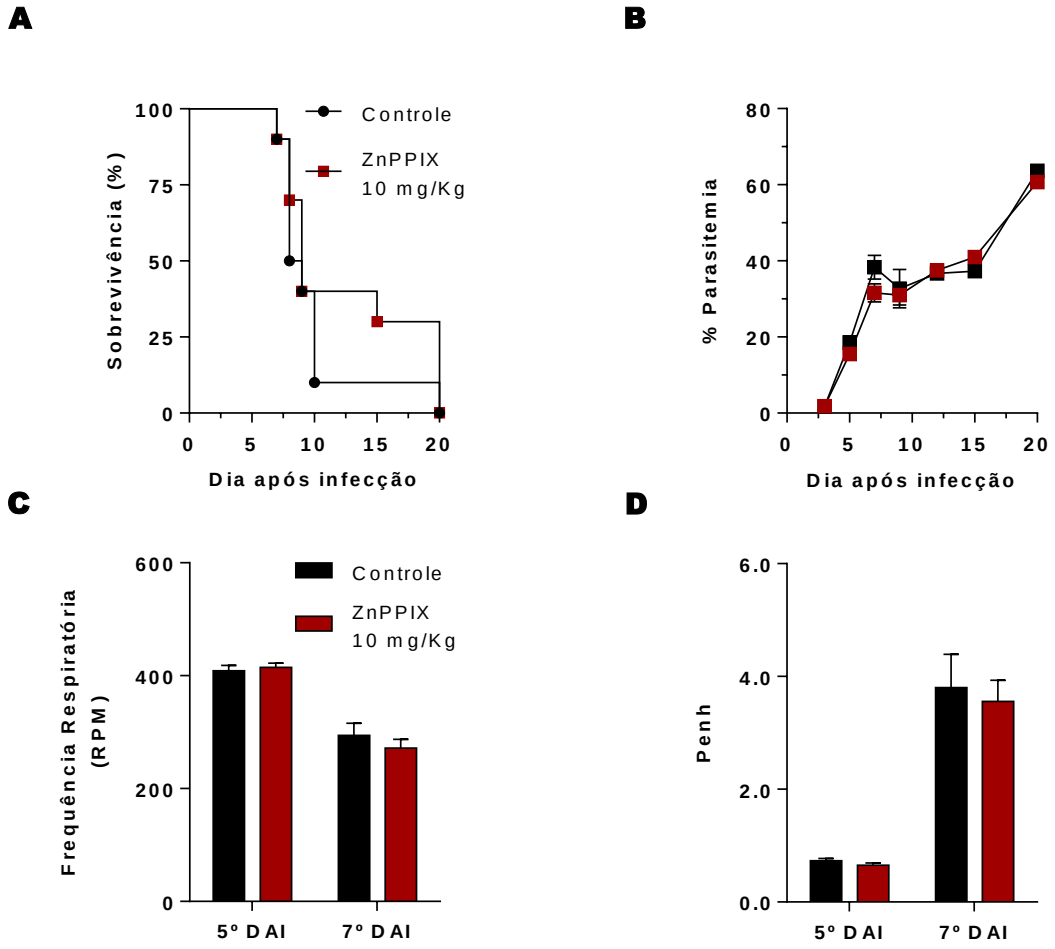


Figura 19 - O tratamento com ZnPPIX não tem efeito na sobrevivência dos animais infectados e nos parâmetros respiratórios. (A) Gráfico de percentagens de sobrevivência de animais tratados e não tratados. (B) Curvas de parasitemia de animais tratados com ZnPPIX no 6º DAI com 10 mg/Kg de ZnPPIX e não tratados. (C e D) Frequência respiratória e Penh dos animais tratados e não tratados (controle) ao 5º DAI e 7º DAI. Os dados dos gráficos A-D representam um experimento com 17 animais.

Posteriormente, para confirmar a ausência de efeitos do ZnPPIX no desenvolvimento da SRDA, observando a sobrevivência e a parasitemia de animais infectados, realizou-se um tratamento continuado, porém com dose mais baixa, devido a toxicidade da droga. Os animais foram tratados continuamente desde o dia 2 antes da infecção até ao 7º DAI (5 mg/Kg/dia), exceto no dia da infecção. Como se pode verificar na **Figura 20**, o tratamento com ZnPPIX não tem efeito na percentagem de sobrevivência, tal como esperado, no entanto, a parasitemia é significativamente diferente ao 5º DAI (**Figura 20B** – teste t de student). Porém, este protocolo de tratamento com ZnPPIX (5 mg/Kg) não tem qualquer efeito na expressão do mRNA de HO-1 (**Figura 20C**).

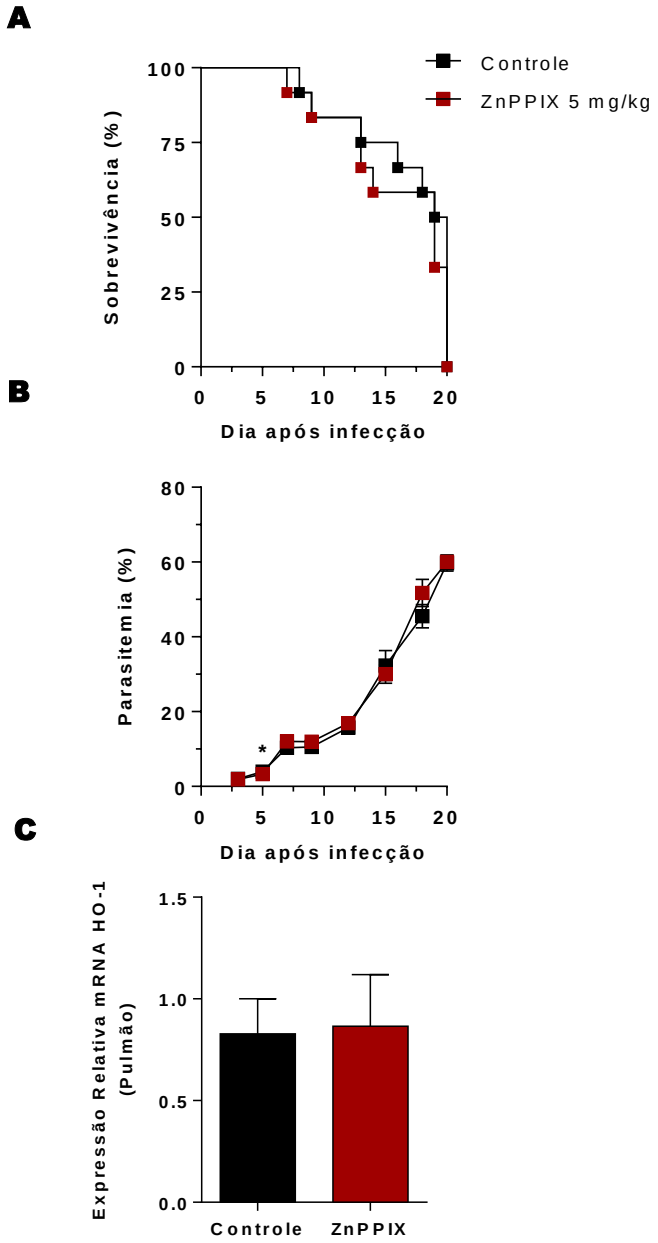


Figura 20 - O tratamento continuado com ZnPPIX não altera o fenótipo dos animais infectados e não modifica a expressão da HO-1 pulmonar. (A) Gráfico de percentagens de sobrevivência de animais tratados e não tratados. Os dados dos gráficos A e B representam um experimento com 25 animais. (B) Curvas de parasitemia de animais tratados todos os dias com ZnPPIX desde o dia 2 antes da infecção até ao 7º DAI com 5 mg/Kg/dia de ZnPPIX e não tratados (teste T não pareado, n=20, p*≤0,05). (C) Ensaio de real-time PCR de pulmão de animais infectados tratados com ZnPPIX (5mg/Kg) e não tratados. Os animais foram eutanasiados no 7º DAI (n=7).

4.8 O tratamento com hemina reduz a permeabilidade em culturas de células endoteliais de pulmão

Culturas primárias de células endoteliais pulmonares foram preparadas a partir de camundongos DBA/2 não-infectados e foram estimuladas com extrato de *P. berghei* ANKA

durante 3 hs. Nas culturas em que se adiciona a hemina, nas concentrações de 5, 10 e 20 µM, há uma redução significativa na área dos espaços entre as células endoteliais, quando comparada com culturas não tratadas (**Figura 21A e 21B**). O tratamento de camundongos com hemina leva a uma diminuição na permeabilidade endotelial pulmão (**Figura 18B**). Para testar se a hemina reduz a permeabilidade no endotélio pulmonar, a mesma foi adicionada a culturas de células endoteliais estimuladas ou não com extrato de *P. berghei* ANKA. Como pode ser visto na **Figura 21C** o tratamento com hemina reduz a permeabilidade do endotélio pulmonar *in vitro*.

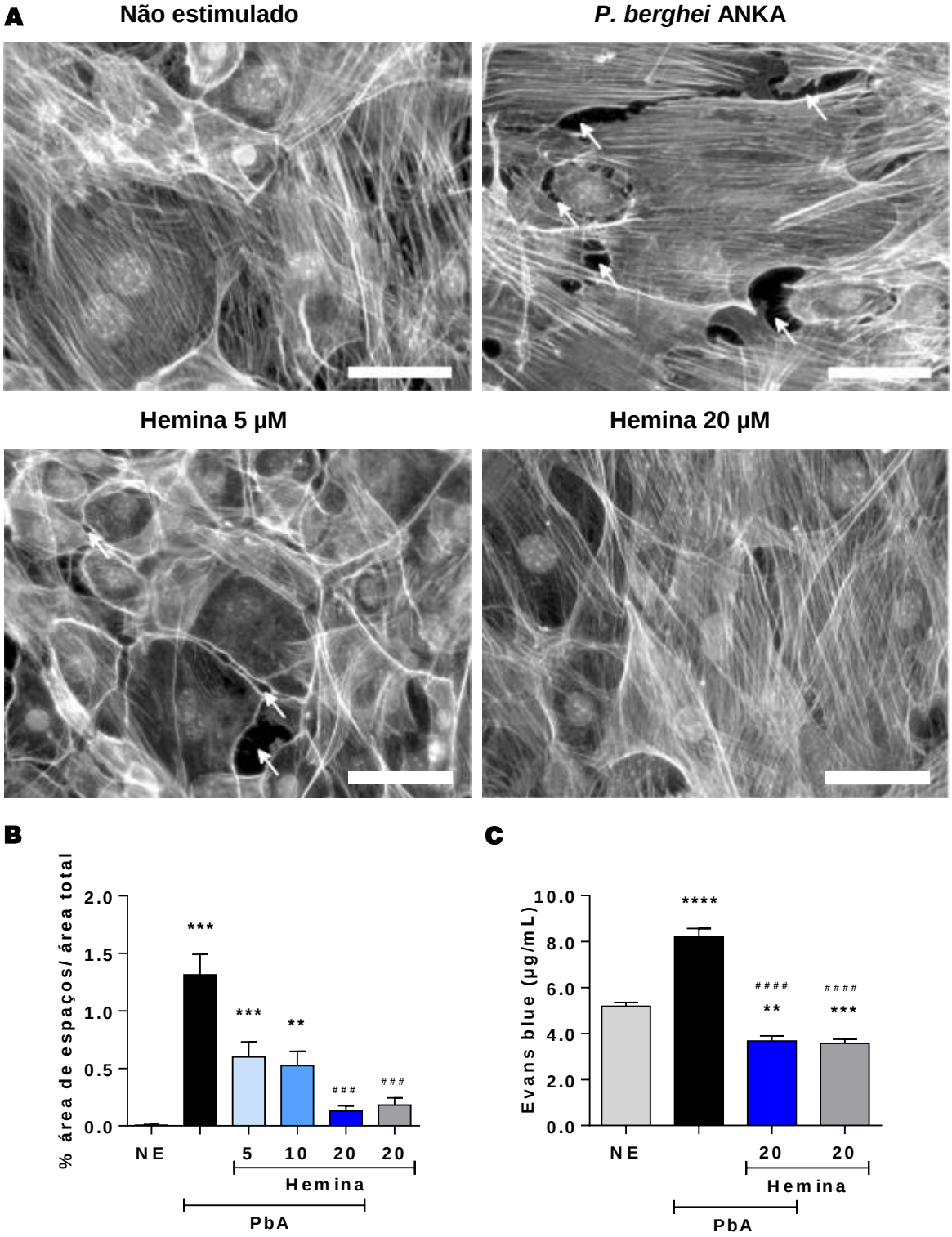


Figura 21 - O tratamento com hemina reduz a área dos espaços intercelulares e a permeabilidade em culturas de células endoteliais de pulmão. Culturas de células endoteliais do pulmão fotografadas por microscopia de fluorescência. Esta figura é representativa de dois experimentos independentes (A e B). (A) Dez a vinte fotos de microscopia de fluorescência foram tiradas por cada cultura estando as representativas apresentadas. As barras de escala têm 50 µm (ampliação de 40x). (B) Gráfico com a relação entre a área de espaços entre as células por área total de cada imagem (teste de Kruskal-Wallis, com o teste de comparações múltiplas de Dunn, n=74, $p^{**} \leq 0.01$, $p^{***} \leq 0.001$, $p^{\#\#\#} \leq 0.001$). NE - cultura de células endoteliais de pulmão sem qualquer estímulo. (C) Teste de permeabilidade das células endoteliais de pulmão (teste de Kruskal-Wallis, com o teste de comparações múltiplas de Dunn, n=24, $p^{**} \leq 0.01$, $p^{***} \leq 0.001$, $p^{****} \leq 0.0001$, $p^{\#\#\#\#} \leq 0.0001$). As diferenças significativas em relação à cultura não estimulada (NE) são representadas por "*" e as diferenças significativas em relação ao extrato (PbA) são representadas por "#".

4.9 O tratamento com hemina não tem efeito anti-apoptótico em células endoteliais do pulmão na presença de extrato do parasita

Com o objetivo de entender os mecanismos da HO-1 na proteção da quebra da barreira alvéolo-capilar, posteriormente verificamos se a apoptose estaria envolvida no aumento da permeabilidade microvascular pulmonar e se a hemina teria um papel anti-apoptótico.

O tratamento com 20 µM de hemina em culturas de células endoteliais não tem efeito na morte celular, tanto em culturas estimuladas com extratos de *P. berghei* ANKA como em culturas não estimuladas (**Figura 22**).

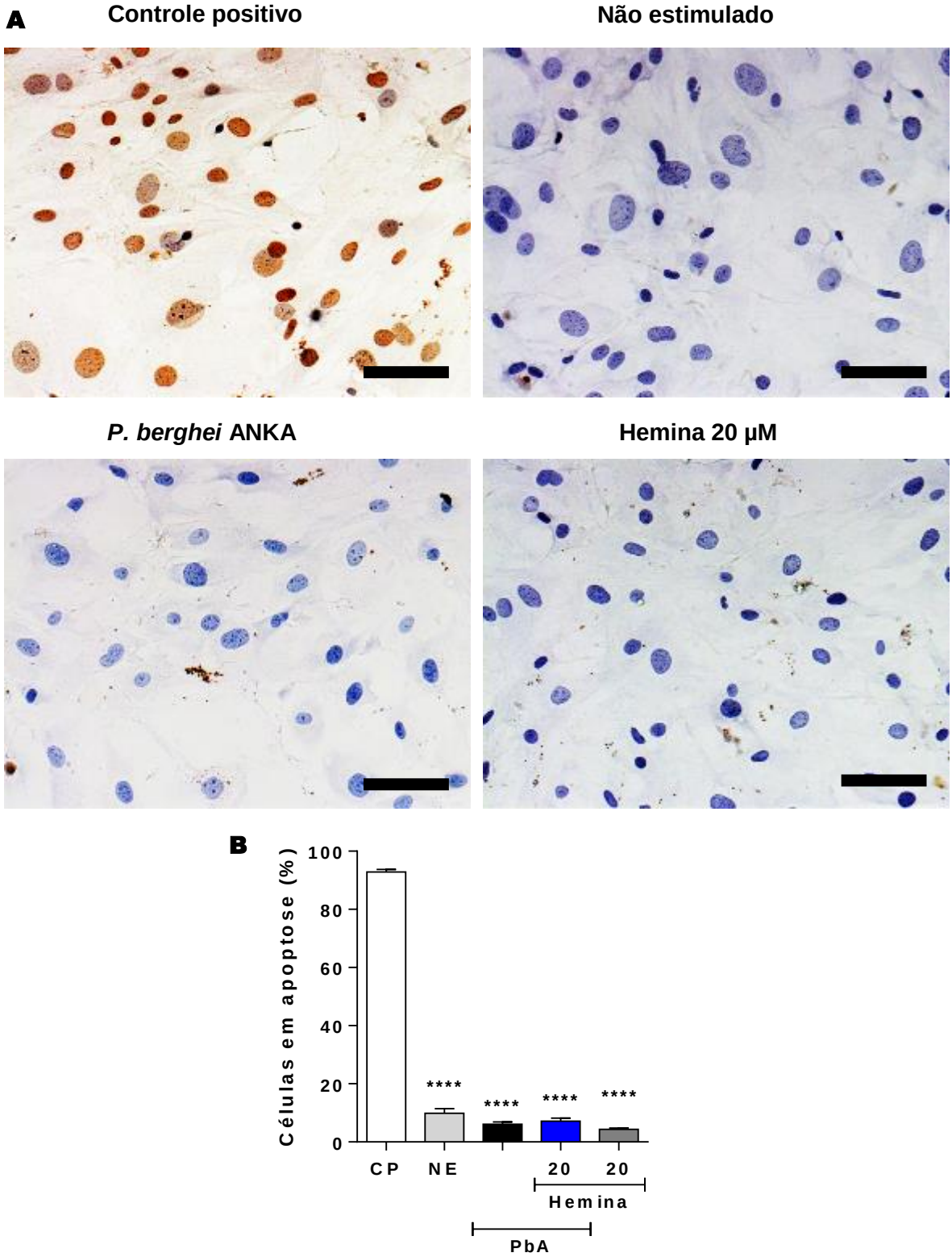


Figura 22 - O tratamento com hemina não tem qualquer efeito na morte celular. (A) Imagens de microscopia óptica de luz transmitida. Metodologia usada: TUNEL, (Controle positivo - DNAse). Os núcleos em apoptose estão corados em marrom e núcleos normais em azul. Escala: 100 µm; ampliação de 20x. (B) Gráfico com percentagem de células em apoptose resultante da contagem de núcleos em cerca de 40 fotos por cultura (teste de Kruskal-Wallis, com o teste de comparações múltiplas de Dunn, n=431, p****≤0,0001; valor de p em relação ao controle positivo - CP).

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi estudar o papel da HO-1 na SDRA associada à malária. Para isso utilizou-se um modelo animal que reproduz as características desta síndrome em humanos (ORTOLAN *et al.*, 2014).

O modelo animal DBA/2 desenvolve SDRA entre o 7º e o 12º DAI, com uma incidência de 30% a 60%, quando infectado com *P. berghei* ANKA (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; ORTOLAN *et al.*, 2014). A **Figura 11** reforça este dado, mostrando que os animais começam a morrer após o 7º DAI. Entre o 7º e o 12º DAI os animais apresentam efusão pleural e pulmões hemorrágicos e congestos, sinais típicos de SDRA. Pela observação da curva de parasitemia da **Figura 11B** pode-se entender que a parasitemia atinge um valor próximo de 20% no início do desenvolvimento da SDRA (7º DAI) e que esse valor tem uma ligeira diminuição até depois do 12º DAI.

A observação de cortes histológicos do pulmão de camundongos DBA/2 revelou características semelhantes às que já tinham sido descritas por Epiphanio e colaboradores (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; ORTOLAN *et al.*, 2014). A presença de edema alveolar, hemorragia alveolar, lesão da parede alveolar e infiltrado inflamatório e menor área alveolar (**Figura 12**) indicam que o animal desenvolveu SDRA. Como esperado estas características estão ausentes em animais com HP e em não infectados (**Figura 12**). Adicionalmente, verificou-se que os animais que desenvolvem SDRA e com edema alveolar possuem mais hemozoína (pigmento malárico) no pulmão (**Figura 13**), do que animais SDRA e sem edema alveolar e em animais HP. Isto sugere que hemozoína acumulada precocemente no tecido pulmonar, decorrente de adesão do parasita, pode potencializar mecanismos de formação do edema alveolar. É interessante observar que o acúmulo de hemozoína pulmonar tardiamente, como observado em animais que morrem de HP, não leva a alterações de parâmetros respiratórios, bem como ao desenvolvimento do edema pulmonar (ORTOLAN *et al.*, 2014).

A HO-1 tem um papel protetor em episódios de malária severa experimental, incluindo a malária cerebral (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; PAMPLONA *et al.*, 2007; PENA *et al.*, 2012). Porém, camundongos DBA/2 que desenvolvem SDRA têm níveis de mRNA e de proteína de HO-1 aumentados em relação a camundongos HP e a camundongos não infectados (**Figuras 14 e 15**). Não se sabe se este aumento se traduz no esforço de reversão do fenótipo SDRA por parte do organismo do camundongo infectado. Como forma de esclarecer qual o papel da HO-1 neste modelo procedeu-se à modulação da mesma.

Como a hemina já tinha sido utilizada como indutora da HO-1, tanto em células humanas *in vitro* (LANG *et al.*, 2005; WALTHER *et al.*, 2012) como em modelos animais (LI, ZHUOMING; WANG; VANHOUTTE, 2011; NAKAMICHI *et al.*, 2005), especialmente em modelos pulmonares (LUO *et al.*, 2014; YIN *et al.*, 2011), este tratamento foi repetido para realização dos nossos ensaios e demonstrou-se efetivo, pois elevou a expressão da HO-1 no pulmão e nos soros de animais não infectados (**Figuras 16A e 16B**).

O tratamento com hemina tem efeitos benéficos em animais infectados e tratados com 17 mg/Kg desta droga (**Figuras 16 a 18**). O tratamento com a hemina leva a um aumento da percentagem de sobrevivência, sendo que apenas 2 animais de um total de 9 morreram de SDRA, enquanto 9 animais não tratados de um total de 10 morreram de SDRA (**Figura 16C**). Este dado é ainda reforçado pela melhoria dos parâmetros respiratórios Penh e frequência respiratória (**Figuras 16E** e **16F**), pela ausência de edema alveolar e aumento da área alveolar (**Figura 17**) e pela melhoria da permeabilidade endotelial pulmonar em camundongos tratados, no 7º DAI (**Figura 18B**), parâmetros estes que são usados como preditivos da SDRA associada à malária no modelo DBA/2 (ORTOLAN *et al.*, 2014). O tratamento com hemina leva ainda a uma redução dos níveis de VEGF sérico (**Figura 18A**), um fator que se mostrou promover o desenvolvimento da SDRA neste modelo (EPIPHANIO *et al.*, 2010a). Além disso sabe-se que o VEGF pode induzir um remodelamento do citoesqueleto das células endoteliais pulmonares (SUKRITI *et al.*, 2014), levando ao aparecimento de espaços entre as junções das células endoteliais (GONZALES; LUCAS; VERIN, 2015) com consequente aumento da permeabilidade e extravasamento de fluido para os alvéolos, característico da SDRA. Como o tratamento com a hemina levou a uma redução da permeabilidade pulmonar e dos níveis séricos de VEGF, a hemina pode estar atuando no sentido de reduzir a expressão de VEGF, diretamente ou indiretamente através da indução da HO-1. Porém, sabe-se que o VEGF tem um papel protetor em modelos de SDRA induzida por hiperoxia, prevenindo a apoptose em células endoteliais. Infelzimente não foi possível quantificar o efeito da hemina na apoptose de células endoteliais pulmonares no nosso modelo, mas pode propor-se a hipótese de que a prevenção da apoptose pelo VEGF não tem um papel central no nosso modelo, mas sim o seu efeito no aumento da permeabilidade endotelial pulmonar.

Por último, a hemina além de reduzir a permeabilidade pulmonar e os níveis de VEGF, reduz também os níveis de citocinas pró-inflamatórias IFN-γ, MCP-1 e TNF- α (**Figuras 18C, D, F, G e H**), o que está de acordo com o aumento de sobrevivência e com melhoria nos parâmetros pulmonares, uma vez que foi demonstrado que o TNF-α induziu a lesão endotelial

vascular pulmonar num modelo animal (GOLDBLUM *et al.*, 1989). Além disso, o acúmulo de neutrófilos no pulmão e o derrame pulmonar que ocorreram em camundongos submetidos a choque hemorrágico estiveram ausentes naqueles que eram knockout para TNF-α (SONG *et al.*, 2001). O IFN-γ também foi considerado como sendo um dos principais contribuintes para SDRA em um modelo murino de hiperoxia, no qual se demonstrou que esta citoquina induziu um aumento da permeabilidade alveolar e da migração de neutrófilos para os alvéolos (YAMADA *et al.*, 2004). O Aumento dos níveis de MCP-1 foi observado em macrófagos alveolares pulmonares isolados de um modelo de rato de SDRA induzida por imunocomplexos (BRIELAND *et al.*, 1992). Isto mostra que a hemina reduziu os níveis de citocinas inflamatórias, que são importantes na SDRA, o que corrobora com resultados anteriores que mostram que a indução da HO-1 por tratamento com hemina tem efeitos anti-inflamatórios em modelos murinos de SDRA induzida por sepse (KONRAD *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2014). Como IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, a qual se observou estar aumentada em animais tratados com hemina, que foram protegidos contra o choque endotóxico (TAMION *et al.*, 2006) e cujo efeito na SDRA mostrou ser protetor (LI, HUAI-DONG *et al.*, 2015), não era esperado que a IL-10 estivesse diminuída em animais tratados com hemina (**Figura 18E**). No entanto, já foi observado que esta citocina estava diminuída em camundongos que não desenvolveram SDRA no nosso modelo (dados não publicados). Estes estudos concluíram assim que a hemina tem um efeito protetor, protegendo os animais da SDRA, corroborando a hipótese de que o aumento dos níveis de HO-1 ao 7º DAI constitui um esforço de reversão do fenótipo SDRA por parte do organismo infectado.

Posteriormente, com o intuito de verificar o efeito de um inibidor da HO-1, uma vez que já sabíamos que a hemina protege os animais da SDRA e que a HO-1 esta está naturalmente elevada em animais infectados com o parasita, utilizou- se o ZnPPIX, um inibidor da HO-1. O tratamento com uma dose de 10 mg/Kg de ZnPPIX, não tem efeito na sobrevivência, bem como nos parâmetros respiratórios dos animais (**Figura 19**). O experimento foi repetido duas vezes, sendo que na última o número de dosagens aumentou para 4 (5 mg/Kg/dia), dadas em dias consecutivos desde o dia 2 antes da infecção até ao 7º DAI (exceto no dia da infecção) o que também não alterou a sobrevivência dos animais em relação ao grupo controle (não tratados) (**Figura 20A**). Este procedimento foi também usado por Pamplona e colaboradores em malária cerebral experimental (PAMPLONA *et al.*, 2007). Nossos dados são condizentes com os descritos por Pamplona e colaboradores onde também

não foi observado efeito da inibição da HO-1, por tratamento com ZnPPIX, no modelo de malária cerebral experimental (PAMPLONA *et al.*, 2007).

Como forma de verificar se o tratamento com ZnPPIX estava sendo efetivo, níveis de mRNA pulmonar da HO-1 foram mensurados em camundongos infectados e eutanasiados ao 7º DAI, sendo que um grupo foi tratado com a ZnPPIX (5mg/Kg/dia) desde o 2º dia antes da infecção até ao 7º DAI (exceto no dia da infecção). A **Figura 20C** mostra que o tratamento não tem efeito nos níveis de mRNA da HO-1, sugerindo que a ZnPPIX não está a inibir a HO-1, o que pode justificar a ausência de efeito no desenvolvimento da SDRA. Porém, o tratamento com ZnPPIX, levou a um agravamento dos sinais de SDRA no caso da sepse (FEI *et al.*, 2012).

Infelizmente, não tivemos acesso a camundongos HO-1 deficientes para testar nossa hipótese, além de que estes camundongos *knockouts* não são procedentes da linhagem DBA/2 (PAMPLONA *et al.*, 2007), o que impossibilitaria a utilização do modelo. O silenciamento do gene HO-1 poderá ser uma alternativa, especialmente se utilizado por via intranasal (ZHANG, YI *et al.*, 2013).

A presença de espaços intercelulares após a lesão pulmonar aguda, num modelo animal, é responsável por um aumento na permeabilidade endotelial no pulmão (HURLEY, 1982). Nossos resultados indicam que o tratamento com hemina de culturas de células endoteliais de pulmão estimuladas com extrato de *P. berghei*, leva a uma diminuição na área dos espaços entre as células (**Figura 21**). Isto corrobora com os resultados da redução da permeabilidade com o tratamento com hemina tanto *in vivo* (**Figura 18B**), quanto *ex vivo* (**Figura 21C**), o que indica que a hemina pode estar a atuar em nível celular, inibindo a formação de espaços entre as células do endotélio pulmonar na presença do parasita e, consequentemente, reduzindo a permeabilidade do pulmão. Outros estudos, apontam a HO-1 como tendo efeito protetor da permeabilidade vascular, em modelo murino de injúria pulmonar induzida por LPS (KONRAD *et al.*, 2016), onde o tratamento com hemina levou à redução da permeabilidade microvascular pulmonar e em culturas de célula endoteliais humanas in vitro (WILSON; KEENAN, 2003), nas quais o tratamento com hemina levou a uma redução da permeabilidade induzida por peróxido de hidrogênio.

Por fim, sabendo que a morte celular das células endoteliais é um mecanismo que leva ao aumento de permeabilidade pulmonar em SDRA (GILL; ROHAN; MEHTA, 2015), testamos se o tratamento com hemina poderia inibir a morte celular de células endoteliais

expostas ao extrato de *P. berghei* ANKA. Não há diferença na percentagem de morte celular entre células tratadas e não tratadas com hemina que são incubadas com extrato do parasita por 3 hs (**Figura 22**). Pode observar-se também que a presença de extrato não aumenta a percentagem de morte celular como se esperaria. Entretanto, dados do nosso laboratório mostram que estas células estimuladas com extrato do parasita por 24 hs, demonstram aumento da morte celular (dados não publicados). Assim sendo, numa repetição do experimento usando o protocolo de incubação com o extrato do parasita por 24 hs em vez de 3 hs já será possível identificar se a hemina poderá reduzir a apoptose das células endoteliais.

Os experimentos realizados neste trabalho demonstram que a hemina, um indutor da HO-1, tem um papel protetor na SDRA associada à malária em modelo murino. O aumento da HO-1 observado em animais que desenvolvem a SDRA pode então ser explicado como um esforço de reversão do fenótipo desta síndrome. O tratamento com hemina numa fase anterior ao desenvolvimento da SDRA mostra-se por isso protetor. Desta forma, a hemina pode ser usada como forma de prevenção da SDRA associada à malária, especialmente em pacientes que finalizaram o tratamento anti-malárico, altura em que tipicamente desenvolvem a SDRA.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho levam-nos a concluir o seguinte:

- a expressão da HO-1 está aumentada ao 7º dia após a infeção em DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA que desenvolveram SDRA quando comparado com animais HP;
- o tratamento com hemina aumenta a expressão da HO-1 em camundongos DBA/2 não infectados;
- o tratamento com hemina alterou o quadro clínico pulmonar de DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, melhorando os parâmetros respiratórios e aumentando a sobrevida destes animais;
- o tratamento com hemina reduziu os níveis de VEGF e a permeabilidade vascular pulmonar em DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.
- o tratamento com hemina mostrou ainda ser eficaz *ex vivo*, reduzindo a permeabilidade de células endoteliais de pulmão de camundongo DBA/2 incubadas com extrato de *P. berghei* ANKA, por diminuição das aberturas intercelulares (junções gap).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

AGARWAL, Anupam; BOLISETTY, Subhashini. Adaptive responses to tissue injury: role of heme oxygenase-1. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association** v. 124, p. 111–22 , 2013.

AITKEN, Elizabeth H *et al.* Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Malaria journal** v. 13, p. 230 , 2014.

ANAND, Paras K.; MALIREDDI, R. K Subbarao; KANNEGANTI, Thirumala Devi. Role of the Nlrp3 inflammasome in microbial infection. **Frontiers in Microbiology** v. 2, n. February, p. 1–6 , 2011.

ARAUJO, Ester C B *et al.* Heme oxygenase-1 activity is involved in the control of Toxoplasma gondii infection in the lung of BALB/c and C57BL/6 and in the small intestine of C57BL/6 mice. **Veterinary research** v. 44, p. 89 , 2013.

ASHBAUGH, D G *et al.* Acute respiratory distress in adults. **Lancet (London, England)** v. 2, n. 7511, p. 319–23 , 1967.

BAER, Kerstin *et al.* Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature. **PLoS pathogens** v. 3, n. 11, p. e171 , 2007.

BAIRD, J Kevin. Evidence and implications of mortality associated with acute Plasmodium vivax malaria. **Clinical microbiology reviews** v. 26, n. 1, p. 36–57 , 2013.

BALLA, G *et al.* Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology** v. 64, n. 5, p. 648–55 , 1991.

BARNWELL, J W *et al.* A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **The Journal of clinical investigation** v. 84, n. 3, p. 765–72 , 1989.

BARTOLONI, Alessandro; ZAMMARCHI, Lorenzo. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases** v. 4, n. 1, p. e2012026 , 2012.

BARUCH, D I *et al.* Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. **Blood** v. 90, n. 9, p. 3766–3775 , 1997

BARUCH, D I *et al.* Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 93, n. 8, p. 3497–502 , 1996.

BORGES DA SILVA, Henrique *et al.* Splenic Macrophage Subsets and Their Function during Blood-Borne Infections. **Frontiers in immunology** v. 6, p. 480 , 2015.

BOUTROS, Cherif N *et al.* Pulmonary expression of inducible heme-oxygenase after ischemia/reperfusion of the lower extremities in rats. **The Journal of surgical research** v. 129, n. 2, p. 306–12 , 2005.

BRIELAND, J K *et al.* Effect of acute inflammatory lung injury on the expression of

[1] De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat pulmonary alveolar macrophages. **American journal of respiratory cell and molecular biology** v. 7, n. 2, p. 134–9 , 1992.

CARVALHO, Bruna O *et al.* On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. **The Journal of infectious diseases** v. 202, n. 4, p. 638–47 , 2010.

CHEN, Q *et al.* The semiconserved head structure of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. **The Journal of experimental medicine** v. 192, n. 1, p. 1–10 , 2000.

CHEN, S F; FEI, X; LI, S H. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. **Microvascular research** v. 50, n. 1, p. 119–28 , 1995.

CHRISTOU, H *et al.* Prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by enhancement of endogenous heme oxygenase-1 in the rat. **Circulation research** v. 86, n. 12, p. 1224–9 , 2000.

CLARK, Ian a *et al.* Induction of HO-1 in tissue macrophages and monocytes in fatal falciparum malaria and sepsis. **Malaria journal** v. 2, p. 41 , 2003.

CONSTANTIN, Jean-Michel *et al.* Response to recruitment maneuver influences net alveolar fluid clearance in acute respiratory distress syndrome. **Anesthesiology** v. 106, n. 5, p. 944–51 , 2007.

CORBETT, C E *et al.* Cytoadherence in human falciparum malaria as a cause of respiratory distress. **The Journal of tropical medicine and hygiene** v. 92, n. 2, p. 112–20 , 1989

CORNE, J *et al.* IL-13 stimulates vascular endothelial cell growth factor and protects against hyperoxic acute lung injury. **The Journal of clinical investigation** v. 106, n. 6, p. 783–91 , 2000.

COSTA, F. T M *et al.* Cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and the infected placenta: a two-way pathway. **Brazilian journal of medical and biological research** v. 39, n. 12, p. 1525–36 , 2006.

CRAPO, J D *et al.* Cell number and cell characteristics of the normal human lung. **The American review of respiratory disease** v. 126, n. 2, p. 332–7 , 1982.

CURTIS, Nigel; FINN, Adam; POLLARD, AJ. **Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX**. New York, NY: Springer New York, 2013. 241-250 p. 764 v.

DEL PORTILLO, Hernando A *et al.* The role of the spleen in malaria. **Cellular microbiology** v. 14, n. 3, p. 343–55 , 2012.

DRAKE, C J *et al.* VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. **Developmental biology** v. 224, n. 2, p. 178–88 , 2000.

DULAK, Jozef *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. **Circulation** v. 117, n. 2, p. 231–41 , 2008.

EPIPHANIO, Sabrina *et al.* VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. **PLoS pathogens** v. 6, n. 5, p. e1000916 , 2010.

FEI, Dongsheng *et al.* Heme oxygenase-1 modulates thrombomodulin and activated protein C levels to attenuate lung injury in cecal ligation and puncture-induced acute lung injury mice. **Experimental lung research** v. 38, n. 4, p. 173–82 , 2012.

FERREIRA, Ana *et al.* A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **Journal of molecular medicine** v. 86, n. 10, p. 1097–111 , 2008.

GALLEGO-DELGADO, Julio *et al.* A surprising role for uric acid: the inflammatory malaria

response. **Current rheumatology reports** v. 16, n. 2, p. 401 , 2014.

GAZZINELLI, Ricardo T *et al.* Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology** v. 14, n. 11, p. 744–757 , 2014.

GERBER, H P; DIXIT, V; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. **The Journal of biological chemistry** v. 273, n. 21, p. 13313–6 , 1998.

GILL, Sean E; ROHAN, Marta; MEHTA, Sanjay. Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury in vivo. **Respiratory research** v. 16, p. 109 , 2015.

GOLDBLUM, S E *et al.* Tumor necrosis factor alpha-induced pulmonary vascular endothelial injury. **Infection and immunity** v. 57, n. 4, p. 1218–26 , 1989.

GONZALES, J N; LUCAS, R; VERIN, A D. The Acute Respiratory Distress Syndrome: Mechanisms and Perspective Therapeutic Approaches. **Austin journal of vascular medicine** v. 2, n. 1 , 2015.

GOOD, Michael F *et al.* Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annual review of immunology** v. 23, n. Journal Article, p. 69–99 , 2005.

GRAILER, Jamison J *et al.* Critical role for the NLRP3 inflammasome during acute lung injury. **Journal of immunology** v. 192, n. 12, p. 5974–83 , 2014.

GREENWOOD, Brian M *et al.* Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of clinical investigation** v. 118, n. 4, p. 1266–76 , 2008.

GUPTE, Suraj. **Recent Advances in Pediatrics - Special Volume 22 - Immunology, Infections and Immunization**. 1st. ed. New Delhi: JP Medical Ltd, 2013. 325 p.

HAMELMANN, E *et al.* Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. **American journal of respiratory and critical care medicine** v. 156, n. 3 Pt 1, p. 766–75 , 1997.

HE, Chuan Hua *et al.* Bcl-2-related protein A1 is an endogenous and cytokine-stimulated mediator of cytoprotection in hyperoxic acute lung injury. **The Journal of clinical investigation** v. 115, n. 4, p. 1039–48 , 2005.

HEE, L.; DINUDOM, A.; MITCHELL, A. J.; GRAU, G. E.; COOK, D. I.; HUNT, N. H.; BALL, H. J. Reduced activity of the epithelial sodium channel in malaria-induced pulmonary oedema in mice. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 1, p. 81–88, 2011.

HILL-KAPTURCZAK, Nathalie; CHANG, Se-Ho; AGARWAL, Anupam. Heme oxygenase and the kidney. **DNA and cell biology** v. 21, n. 4, p. 307–21 , 2002.

HOLTER, J F *et al.* Protein permeability in the adult respiratory distress syndrome. Loss of size selectivity of the alveolar epithelium. **The Journal of clinical investigation** v. 78, n. 6, p. 1513–22 , 1986.

HURLEY, J V. Types of pulmonary microvascular injury. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 384, p. 269–86 , 1982.

IDRO, Richard *et al.* Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. **Pediatric research** v. 68, n. 4, p. 267–74 , 2010.

JABAUDON, Matthieu *et al.* Net alveolar fluid clearance is associated with lung morphology phenotypes in acute respiratory distress syndrome. **Anaesthesia, critical care & pain medicine** , 2016.

JOO CHOI, Ran; CHENG, Mao-Sheng; SHIK KIM, Yeong. Desoxyrhapontigenin up-regulates Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression in macrophages and inflammatory lung injury. **Redox biology** v. 2, n. 1, p. 504–12 , 2014.

KIRCHGATTER, Karin; DEL PORTILLO, Hernando A. Clinical and molecular aspects of severe malaria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 77, n. 3, p. 455–75 , 2005.

KONRAD, F M *et al.* Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation. **Mucosal immunology** v. 9, n. 1, p. 98–111 , 2016.

LACERDA, Marcus Vg G *et al.* Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria journal** v. 11, p. 12 , 2012.

LANG, Detlef *et al.* Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis despite caspase-3 up-regulation. **International immunology** v. 17, n. 2, p. 155–65 , 2005.

LANGOUCHE, Lies *et al.* Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. **The Journal of clinical investigation** v. 115, n. 8, p. 2277–86 , 2005.

LI, Huai-Dong *et al.* Exogenous interleukin-10 attenuates hyperoxia-induced acute lung injury in mice. **Experimental physiology** v. 100, n. 3, p. 331–40 , 2015.

LI, Zhuoming; WANG, Yu; VANHOUTTE, Paul M. Upregulation of heme oxygenase 1 by hemin impairs endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension** v. 58, n. 5, p. 926–34 , 2011.

LIVAK, K J; SCHMITTGEN, T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)** v. 25, n. 4, p. 402–8 , 2001.

LOMASK, Morton. Further exploration of the Penh parameter. **Experimental and toxicologic pathology** v. 57 Suppl 2, p. 13–20 , 2006.

LOVEGROVE, Fiona E *et al.* Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. **PLoS pathogens** v. 4, n. 5, p. e1000068 , 2008.

LUO, Yun-peng *et al.* Hemin inhibits NLRP3 inflammasome activation in sepsis-induced acute lung injury, involving heme oxygenase-1. **International immunopharmacology** v. 20, n. 1, p. 24–32 , 2014.

Malaria Atlas Project. Disponível em: <http://www.map.ox.ac.uk/explore/countries/BRA/>. Acesso em: 8 jan. 2015.

MATTHAY, Michael A; WARE, Lorraine B; ZIMMERMAN, Guy A. The acute respiratory distress syndrome. **The Journal of clinical investigation** v. 122, n. 8, p. 2731–40 , 2012.

MEDFORD, Andrew R L *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) isoform expression and activity in human and murine lung injury. **Respiratory research** v. 10, n. 1, p. 27 , 2009.

MENG, Fanyong *et al.* Asef mediates HGF protective effects against LPS-induced lung injury and endothelial barrier dysfunction. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology** v. 308, n. 5, p. L452-63 , 2015.

MOHAN, A.; SHARMA, S. K.; BOLLINENI, S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. **Journal of vector borne diseases**, v. 45, n. 3, p. 179–193, 2008.

MONAHAN, Laura J. Acute respiratory distress syndrome. **Current problems in pediatric and adolescent health care** v. 43, n. 10, p. 278–84 , 2013.

MOTTERLINI, Roberto; OTTERBEIN, Leo E. The therapeutic potential of carbon monoxide. **Nature reviews. Drug discovery** v. 9, n. 9, p. 728–43 , 2010.

MUANZA, K *et al.* Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadherence. **Research in immunology** v. 147, n. 3, p. 149–63 , 1996.

NAKAGAMI, T *et al.* A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. **Biochimica et biophysica acta** v. 1158, n. 2, p. 189–93 , 1993.

NAKAMICHI, Ikuo *et al.* Hemin-activated macrophages home to the pancreas and protect from acute pancreatitis via heme oxygenase-1 induction. **The Journal of clinical investigation** v. 115, n. 11, p. 3007–14 , nov. 2005.

NG, Y S *et al.* Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists** v. 220, n. 2, p. 112–21 , 2001.

OQUENDO, P *et al.* CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. **Cell** v. 58, n. 1, p. 95–101 , 1989.

ORTOLAN, Luana S *et al.* Predictive criteria to study the pathogenesis of malaria-associated ALI/ARDS in mice. **Mediators of inflammation** v. 2014, p. 872464 , 2014.

OTTERBEIN, L; SYLVESTER, S L; CHOI, A M. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. **American journal of respiratory cell and molecular biology** v. 13, n. 5, p. 595–601 , 1995.

PAMPLONA, Ana *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Nature medicine** v. 13, n. 6, p. 703–10 , 2007.

PENA, Ana C. *et al.* A novel carbon monoxide-releasing molecule fully protects mice from severe malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 56, n. 3, p. 1281–1290 , 2012.

PRICE, Laura *et al.* Acute respiratory distress syndrome in Plasmodium vivax malaria: case report and review of the literature. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 101, n. 7, p. 655–9 , 2007.

PRUDÊNCIO, Miguel; RODRIGUEZ, Ana; MOTA, Maria M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. **Nature reviews. Microbiology** v. 4, n. 11, p. 849–856 , 2006.

RAHIMI, Bilal Ahmad *et al.* Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. **Malaria journal** v. 13, p. 481 , 2014.

RANIERI, V Marco *et al.* Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. **JAMA : the journal of the American Medical Association** v. 307, n. 23, p. 2526–33 , 2012.

SCHRODER, Kate; TSCHOPP, Jurg. The inflammasomes. **Cell** v. 140, n. 6, p. 821–32 , 2010.

SHERMAN, Irwin W; EDA, Shigetoshi; WINOGRAD, Enrique. Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: defining the ties that bind. **Microbes and infection** v. 5, n. 10, p. 897–909 , 2003.

SHU, Jie; QIU, Guoping; ILYAS, Mohammad. *Immunohistochemistry (IHC) Image Analysis Toolbox*. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/ihc-toolbox/index.html>. Acesso

em: 8 jan. 2015.

SINER, Jonathan M *et al.* VEGF-induced heme oxygenase-1 confers cytoprotection from lethal hyperoxia in vivo. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** v. 21, n. 7, p. 1422–32 , 2007.

SINGH, Balbir; DANESHVAR, Cyrus. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. **Clinical microbiology reviews** v. 26, n. 2, p. 165–84 , 2013.

SOARES, M P *et al.* Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. **Nature medicine** v. 4, n. 9, p. 1073–7 , 1998.

SONG, Y *et al.* A low level of TNF-alpha mediates hemorrhage-induced acute lung injury via p55 TNF receptor. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology** v. 281, n. 3, p. L677-84 , 2001.

STANISIC, Danielle I *et al.* γδ T cells and CD14+ monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines associated with severe malaria. **The Journal of infectious diseases** v. 210, n. 2, p. 295–305 , 2014.

STOCKER, R *et al.* Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. **Science** v. 235, n. 4792, p. 1043–6 , 1987.

SUKRITI, Sukriti *et al.* Mechanisms regulating endothelial permeability. **Pulmonary circulation** v. 4, n. 4, p. 535–51 , 2014.

TAMION, Fabienne *et al.* Protective effects of heme-oxygenase expression against endotoxic shock: inhibition of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of interleukin-10. **The Journal of trauma** v. 61, n. 5, p. 1078–84 , 2006.

THIEL, Manfred *et al.* Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. **PLoS biology** v. 3, n. 6, p. e174 , 2005.

TRACZ, Michal J; ALAM, Jawed; NATH, Karl A. Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology** v. 18, n. 2, p. 414–20 , 2007.

TSUBURAI, Takahiro *et al.* Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase 1 cDNA in lung prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a Fas-Fas ligand-independent pathway. **Human gene therapy** v. 13, n. 16, p. 1945–60 , 2002.

UMBERS, Alexandra J; AITKEN, Elizabeth H; ROGERSON, Stephen J. Malaria in pregnancy: small babies, big problem. **Trends in parasitology** v. 27, n. 4, p. 168–75 , 2011.

VAN DEN STEEN, Philippe E *et al.* Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 181, n. 9, p. 957–968, 2010.

VAN DER HEYDE, Henri C *et al.* A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. **Trends in parasitology** v. 22, n. 11, p. 503–8 , 2006.1471-4922 (Print)r1471-4922 (Linking).

WALTHER, Michael *et al.* HMOX1 gene promoter alleles and high HO-1 levels are associated with severe malaria in Gambian children. **PLoS pathogens** v. 8, n. 3, p. e1002579 , 2012.

WASSMER, Samuel C; COMBES, Valéry; GRAU, Georges E. Pathophysiology of cerebral malaria: role of host cells in the modulation of cytoadhesion. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 992, n. 1, p. 30–8 , 2003.

WAXMAN, A B *et al.* Targeted lung expression of interleukin-11 enhances murine tolerance of 100% oxygen and diminishes hyperoxia-induced DNA fragmentation. **The Journal of clinical investigation** v. 101, n. 9, p. 1970–82 , 1998.

WHO. **World Malaria Report 2014**. Geneva: World Health Organization, 2014. 242 p.

WHO. **World Malaria Report 2015**. Geneva: World Health Organization, 2015. 280 p.

WILSON, Stephen J; KEENAN, Alan K. Role of hemin in the modulation of H2O2-mediated endothelial cell injury. **Vascular pharmacology** v. 40, n. 2, p. 109–18 , fev. 2003.

YAMADA, Mitsuhiro *et al.* Interferon-gamma: a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology** v. 287, n. 5, p. L1042-7 , 2004.

YIN, Hui *et al.* Heme oxygenase-1 ameliorates LPS-induced acute lung injury correlated with downregulation of interleukin-33. **International Immunopharmacology** v. 11, n. 12, p. 2112–2117 , 2011.

ZHANG, Xuchen *et al.* Endothelial STAT3 is essential for the protective effects of HO-1 in oxidant-induced lung injury. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** v. 20, n. 12, p. 2156–8 , 2006.

ZHANG, Xuchen *et al.* Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. **American journal of respiratory cell and molecular biology** v. 28, n. 3, p. 305–15 , 2003.

ZHANG, Xuchen *et al.* Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. **The Journal of biological chemistry** v. 279, n. 11, p. 10677–84 , 2004.

ZHANG, Yi *et al.* Lung endothelial HO-1 targeting in vivo using lentiviral miRNA regulates apoptosis and autophagy during oxidant injury. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** v. 27, n. 10, p. 4041–58 , 2013.

APÊNDICES

Apêndice A - PEREIRA, M. L. M.; ORTOLAN, L. S.; SERCUNDES, M. K.; DEBONE, D.; MURILLO, O.; LIMA, F. A.; MARINHO, C. R. F.; EPIPHANIO, S. Association of heme oxygenase 1 with lung protection in malaria-associated ALI/ARDS. **Mediators of Inflammation**. Unpublished manuscript.

ASSOCIATION OF HEME OXYGENASE 1 WITH LUNG PROTECTION IN MALARIA-ASSOCIATED ALI/ARDS

Marcelo L. M. Pereira[a]; Luana S. Ortolan[a]; Michelle K. Sercundes[b]; Daniela Debone[b]; Oscar Murillo[c]; Flávia A. Lima[c]; Claudio R. F. Marinho[c] and Sabrina Epiphanio[b#]

Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil[a]; Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil[b]; Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil[c].

[#] Corresponding author: Sabrina Epiphanio: sabrinae@usp.br

*These authors contributed equally to this work.

Running Head: HO-1 and lung protection in MA-ALI/ARDS

Apêndice B - PEREIRA, M. L. M.; MARINHO, C. R. F.; EPIPHANIO, S. The protective role of heme oxygenase 1 in malaria-associated ALI/ARDS. **Frontiers in Bioscience**. Unpublished manuscript.

THE PROTECTIVE ROLE OF HEME OXYGENASE 1 IN MALARIA-ASSOCIATED ALI/ARDS

Marcelo L. M. Pereira[1]; Claudio R. F. Marinho[2] and Sabrina Epiphanio[3#]

[1] Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

[2] Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

[3] Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.