LUANA DOS SANTOS ORTOLAN

CITOADESÃO NA IMUNOPATOGÊNESE DA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO ASSOCIADO 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
2017

LUANA DOS SANTOS ORTOLAN

CITOADESÃO NA IMUNOPATOGÊNESE DA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO ASSOCIADO 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

Orientador: Profa. Dra. Sabrina Epiphanio

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio R. Farias Marinho

Versão Original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

dos Santos Ortolan, Luana
Citoadesão na imunopatogênese da síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária / Luana dos Santos Ortolan; orientadora Sabrina Epiphanio; coorientador Claudio Romero Farias Marinho. -- São Paulo, 2017.
155 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Plasmodium. 2. Malária. 3. Adesão. 4. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. 5. Inflamação. I. Epiphanio, Sabrina, orientador. II. Romero Farias Marinho, Claudio, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: **Luana dos Santos Ortolan**

Título da Tese: **Citoadesão na imunopatogênese da síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária**

Orientador: **Sabrina Epiphanio**

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

( ) Aprovado **( ) Reprovado**

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

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

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

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

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

COMITÊ DE ÉTICA

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 **24** nas fls. **16** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Sabrina Epiphanio,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*O papel da citoadesão e dos receptores do tipo Toll (TLRs) na imunopatogênese da síndrome do desconforto respiratório agudo murino associado à malária grave*" do qual participam o(s) aluno(s) **Luana dos Santos Ortolan,** pesquisador **Claudio Romero Farias 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 **25.03.2014, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 27 de março de 2014.

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

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

Este trabalho foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Bolsa de Doutorado, Processo nº 2013/20718-3.

À minha família;

Entre todas as coisas, vocês são as mais importantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por não me deixar desistir em frente às dificuldades.

Agradeço de todo coração minha família, por ser meu alicerce, meu porto seguro, pelo amor, incentivo, pela compreensão e pela dedicação o tempo todo, especialmente minha mãe Vera Lúcia dos Santos Ortolan, meu pai Irineu Célio Ortolan, meu irmão Gustavo dos Santos Ortolan. Amo vocês, obrigada por todo apoio!

Ao meu querido Marcelo Castilho Cassiano por estar sempre ao meu lado, pela paciência, auxílio, por acreditar em meu potencial e me incentivar sempre.

A todos os meus familiares que estiveram sempre presentes na minha vida e que acreditaram em mim.

À minha orientadora, Dra. Sabrina Epiphanio, pela credibilidade depositada em mim para realização deste trabalho, pelo apoio e pelos ensinamentos. Sou grata por todo o conhecimento compartilhado, confiança, paciência e amizade. Todos os ensinamentos me permitiram um enorme crescimento pessoal e científico. Obrigada.

Ao professor Dr. Claudio Marinho, por abrir as portas do seu laboratório, por toda ajuda, apoio, credibilidade, sugestões e auxílio. Obrigada!

Às minhas queridas amigas e companheiras de laboratório, Michelle Klein Sercundes e Daniela Debone pela amizade, pelo companheirismo, pela descontração, pela união, apoio e auxílio. Muito obrigada!

A Thatyane Castro Quirino e Gabriel Cândido Moura, por todo apoio no laboratório, amizade, cumplicidade e por todas as risadas!

A Dra. Liliam Fernandes, professora da UNIFESP campus Diadema, por me ensinar como preparar as culturas primárias de células endoteliais pulmonares, essenciais para a realização deste trabalho.

Aos professores Dra. Maria Regina D'Império Lima, Professor Dr. Whotan Tavares e Professora Dra. Lilian Fernandes que participaram do meu exame de qualificação, por todo apoio e sugestões.

Aos demais companheiros da pós-graduação: Tarsila Camargo, Oscar Murillo, Aramys Reis, Marcelo Pereira, Jamille Dowbroski, Rodrigo Medeiros, Carla Bandeira, Natércia Regina, Douglas de Sousa, Rafael Salgado, Beatriz Villas Bôas, Maria Menezes, Alejandra Marin, Renato Barboza, pela amizade, companheirismo e

por todas as discussões científicas e não científicas, pela companhia e pela amizade. Obrigada!

À Erika Machado pela amizade, auxílios técnico e científico.

À Sonia Buratto e a Patrícia Mendonça da Silva Amorim, técnicas do laboratório, não só pelo auxílio técnico, mas pela amizade e por todas as conversas.

À CAPES pela bolsa concedida para a realização desse trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida e por todo o suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Ciências Biomédicas pela oportunidade de fazer parte do seu corpo discente, bem como pelo conhecimento gerado e adquirido dentro dessa instituição.

À todos que contribuíram para a realização desse trabalho e para a minha formação científica, muito obrigado.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

ORTOLAN, L. S. **Citoadesão na imunopatogênese da síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária.** 2017. 155 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A malária é um dos maiores problemas de saúde global, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Infecções por *Plasmodium* sp. podem levar a complicações pulmonares denominadas síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), caracterizadas por inflamação aguda, lesão do endotélio alveolar e do parênquima pulmonar e disfunção e aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar. O modelo experimental, que utiliza o parasita murino *Plasmodium berghei* ANKA e camundongos da linhagem DBA/2, é empregado no estudo de mediadores imunológicos e fatores que propiciam o estabelecimento das lesões pulmonares associados à SDRA. Camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) foram classificados de acordo com a causa de morte como SDRA ou HP (hiperparasitemia). Os pulmões foram coletados para análise da capacidade respiratória pulmonar, histopatológica, para ensaios de permeabilidade vascular, para qRT-PCR e imunoistoquímica. Camundongos DBA/2 foram também infectados com PbA luciferase para avaliar a distribuição de parasitas *in vivo*. Para avaliar o efeito anti-inflamatório no desenvolvimento da síndrome, os camundongos foram tratados com Dexametasona. *Ex vivo*, células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2) foram estimuladas com IFN-γ, TNF, VEGF, LPS, extrato do parasita (Ext), eritrócitos parasitados (EP) ou com eritrócitos não parasitados (EnP) em diferentes tempos de exposição. Estas células foram analisadas em ensaios de citoadesão estático e em fluxo, por expressão gênica, em co-culturas com células inflamatórias e em ensaios de inibição de moléculas específicas e de permeabilidade. Nossos resultados demonstraram que há acúmulo de PbA nos pulmões de DBA/2 que desenvolveram SDRA e que TNF e IFN-γ aumentam a citoadesão em CEPP-DBA/2, bem como a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e EPCR. Além disso, mostramos que a inibição de TNF diminui a adesão de EP. Também observamos que dexametasona protege os animais da SDRA através da diminuição de fatores inflamatórios, expressão gênica de EPCR e através da inibição da abertura de junções interendoteliais. Em conclusão, identificamos que o aumento da citoaderência de PbA-EP nos pulmões de camundongos DBA/2 está relacionada com a patogênese de SDRA associada à malária e que fatores inflamatórios, especialmente TNF e IFN-γ aumentam a expressão de moléculas de adesão, em especial EPCR. Ainda, concluímos que a intervenção com dexametasona protege os animais do desenvolvimento da SDRA associada à malária (SDRA-AM) devido preservação da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar. A intervenção da citoaderênca e da permeabilidade vascular pulmonar com o uso de corticosteróies, pode ser um importante alvo para o tratamento e a prevenção da SDRA-AM.

Palavras-chave: *Plasmodium*. Malária. Adesão. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. Inflamação.

ABSTRACT

ORTOLAN, L. S. **Cytoadhesion in the immunopathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome.** 2017. 155 p. Ph. D thesis (immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Malaria is one of the most serious global health problems, especially in tropical and subtropical regions. Infections by *Plasmodium sp*. can lead to pulmonary complications named acute respiratory distress syndrome (ARDS), characterized by acute inflammation, damage of the alveolar endothelium and pulmonary parenchyma, dysfunction and increased permeability of the alveolar-capillary barrier. The experimental model, using the murine parasite *Plasmodium berghei* ANKA and DBA/2 mice, is used to study immunological mediators and factors that allow the establishment of lung lesions associated with ARDS. DBA/2 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) were classified according to cause of death as ARDS or HP (hyperparasitemia). Lungs were collected for analysis of respiratory capacity, histological analyses by qRT-PCR and immunohistochemistry. DBA/2 mice were also infected with PbA luciferase to evaluate a parasite distribution *in vivo*. To evaluate the anti-inflammatory effect in the ARDS development, DBA/2 mice were treated with dexamethasone. *Ex vivo*, primary culture of pulmonary endothelial cells from DBA/2 mice (PPEC-DBA/2) were stimulated with IFN-γ, TNF, VEGF, LPS, parasite extract (Ext), parasitized erythrocytes (PE) or with non-parasitized erythrocytes at different exposure times. These cells were analyzed through immunofluorescence, static and flow cytoadhesion tests, mRNA expression, cytokines production, co-culture with inflammatory cells and specific molecules inhibition and permeability assays. Our results demonstrate that there was an accumulation of PbA in the lungs of DBA/2 mice which developed ARDS. Also, TNF and IFN-γ increased the cytoadhesion of PE in CEPP-DBA/2, as well as the expression of ICAM-1, VCAM-1 and EPCR. Moreover, the inhibition of TNF decreased the adherence of PE in PPEC-DBA/2. We also observed that dexamethasone protected animals from ARDS by decreasing inflammatory factors, gene expression of EPCR and inhibited the opening of interendothelial junctions. In conclusion, we identified that the increased cytoadherence of PbA-PE in the lungs of DBA/2 mice is related to the pathogenesis of malaria-associated ARDS, and the inflammatory factors (TNF and IFN-γ) increase the expression of adhesion molecules, especially EPCR. In adittion, the treatment with dexamethasone protects the animals from the development of malaria-associated ARDS (MA-ARDS), due to preservention of the alveolar-capillary permeability barrier. The intervention of the cythoadherence and pulmonary vascular permeability using corticosteroids may be an important target for treatment and prevention of MA-ARDS.

Keywords: *Plasmodium*. Malaria. Adhesion. Acute Respiratory Distress Syndrome. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição dos países com malária endêmica em 2000 e 2016. 27
Figura 2 - Países da américa do Sul com malária endêmica. 29
Figura 3 - Ciclo de vida do Plasmodium sp. 34
Figura 4 - Número e proporção de admissões hospitalares no Brasil. 42
Figura 5 - Fase exsudativa da síndrome do desconforto respiratório agudo. 45
Figura 6 - Câmaras plestimográficas. 59
Figura 7 - Fluxo respiratório e aumento da pausa respiratória. 60
Figura 8 - Modelo preditivo para classificação dos animais em SDRA ou HP. 61
Figura 9 - Isolamento de formas maduras de eritrócitos parasitados. 65
Figura 10 - Ensaios com células endoteliais. 66
Figura 11 - Esquema representativo de ensaio de adesão estático. 70
Figura 12 - Esquema representativo de ensaio de adesão em fluxo. 71
Figura 13 - Análise dos tecidos marcados por imunoistoquimica. 74
Figura 14 - Representação do ensaio de transwell® realizado em co-culturas de células endoteliais pulmonares e macrófagos peritoneais ou neutrófilos da medula óssea. 77
Figura 15 – Esquema representativo do tratamento com dexametasona. 78
Figura 16 - Ensaio de permeabilidade vascular por sistema de Transwell®. 80
Figura 17 - Sobrevivência, parasitemia e padrões respiratórios do modelo experimental de SDRA associado à malária. 84
Figura 18 - Distribuição da bioluminescência de Plasmodium berghei ANKA luciferase em camundongos DBA/2. 86
Figura 19 - Distribuição da bioluminescência de Plasmodium berghei ANKA luciferase em animais com SDRA e HP. 87
Figura 20 - Imunoistoquímica para marcação de ICAM-1, VCAM e CD36 em pulmões de camundongos DBA/2 infectados com Plasmodium berghei ANKA. 89
Figura 21 - Perfil respiratório, parasitemia, sobrevivência e análise histológica de camundongos DBA/2 infectados com Plasmodium berghei ANKA e tratados com dexametasona. 91
Figura 22 – O tratamento com dexametasona reduz os níveis séricos de TNF, IL-6 e IL-33 em camundongos DBA/2 infectados com Plasmodium berghei ANKA. 92

Figura 23 - Tratamento com dexametasona altera a expressão gênica de Plasmodium berghei ANKA e EPCR em pulmões de camundongos DBA/2 infectados com Plasmodium berghei ANKA. 94
Figura 24 - A hemozoína acumula em pulmões de camundongos DBA/2 infectados com Plasmodium berghei ANKA tratados com dexametasona. 95
Figura 25 - Dexametasona diminui a permeabilidade vascular pulmonar em camundongos DBA/2 infectados com Plasmodium berghei ANKA tratados com dexametasona no 7º dia após-infecão. 96
Figura 26 – Aspecto morfológico das células endoteliais pulmonares primárias.....97
Figura 27 – Caracterização de culturas primárias de células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2. 98
Figura 28 - Células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 tratadas com diferentes estímulos e em diferentes tempos permanecem viáveis de acordo com a técnica de MTT. 99
Figura 29 - Células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 tratadas em diferentes tempos e com diferentes estímulos permanecem viáveis de acordo com a marcação de 7AAD por citometria de fluxo. 100
Figura 30 - Células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 produzem VEGF e a produção é independente do estímulo.....101
Figura 31 – A produção de GM-CSF em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 aumenta após estímulo com extrato do parasita, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS.....103
Figura 32 - A produção IL-1β em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 não depende do tempo e do estímulo. 104
Figura 33 - A produção de IL-6 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 aumenta após estímulo com extrato do parasita, EP-PbA, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS.....106
Figura 34 – A produção de IL-6 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 aumenta após estímulo com extrato do parasita, EP-PbA, EnP, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS.....107
Figura 35 - A produção de MCP-1 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 aumenta após estímulo com extrato do parasita, EP-PbA, EnP, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS.....109

Figura 36 - A produção RANTES em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 aumenta após estímulo com extrato do parasita, EP-PbA, EnP, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS. 111
Figura 37 - Adesão de eritrócitos parasitados com Plasmodium berghei ANKA é maior em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 estimuladas com VEGF, extrato, LPS e TNF. 113
Figura 38 – TNF aumenta a adesão de eritrócitos parasitados com Plasmodium berghei ANKA em ensaio de adesão em fluxo 114
Figura 39 - Expressão gênica de ICAM-1 em culturas de células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2. 116
Figura 40 - Expressão gênica de VCAM em culturas de células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2. 117
Figura 41 - Expressão gênica de CD36 em culturas de células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2. 118
Figura 42 - Expressão gênica de EPCR em culturas de células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2. 119
Figura 43 - Estratégia da análise das moléculas de adesão em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 por citometria de fluxo. 120
Figura 44 - Células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 produzem TNF quando estimuladas com eritrócitos parasitados com Plasmodium berghei ANKA. 121
Figura 45 - Eritrócitos parasitados de Plasmodium berghei ANKA em contato com macrófagos promovem a citoadesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2. 122
Figura 46 - Eritrócitos parasitados de Plasmodium berghei ANKA em contato com neutrófilos promovem a citoadesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2. 123
Figura 47 - A neutralização de TNF diminui a adesão de EP-PbA em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2. 124
Figura 48 – Dexametasona diminui a permeabilidade nas células endotelais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 estimulados com eritrócitos parasitados de Plasmodium berghei ANKA. 125
Figura 49 – A dexametasona diminui a abertura de junções interendoteliais promovida pelos eritrócitos parasitados de Plasmodium berghei ANKA. 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro com os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real. 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Enzima Conversora da Angiotensina (*Angiotensine-Converting Enzyme*)
APC	Proteina C ativada (*activated protein C*)
CBA	*Cytometric Bead Array*
CD36	Grupo de Diferenciação (*Cluster of Differentiation 36*)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CEPP	Célula endotelial pulmonar primária
CEPP-DBA/2	Célula endotelial pulmonar primária de animais DBA/2
Cx	Conexinas
DAB	(3,3 – Diaminobenzidina)
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (*Damage-associated molecular patterns)*
DEMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid)*
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima *(Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay)*
eNOS	Óxido Nitrico Sintase Endotelial (*Endothelial nitric oxide synthase*)
EnP	Eritrócito não Parasitado
EP	Eritrócito Parasitado
EP-PbA	Eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA
EPCR	Receptor da proteína C endotelial *(Endothelial Protein C Receptor)*
Ext-PbA	Extrato de eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
FiO_2	Fração Inspirada de Oxigênio
FR	Frequência Respiratória
GPI	Glicosilfosfatidilinositol (*Glycosylphosphatidylinositol*)
HBSS	*Hank's Balanced Salt Solution*

HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferase (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*)
H&E	Hematoxilina e Eosina
Hz	Hemozoína
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular -1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*)
IFN-γ	Interferon- gama
IL-1β	Interleucina 1 beta (*Interleukin-1 beta*)
IL-6	Interleucina 6 (*Interleukin 6*)
JAs	Junções de aderência
KC/ CXCL1	Quimiocina quimioatrativa de queratinócitos (*Keratinocyte chemoattractant*)
LPA	Lesão Pulmonar a Aguda
SDRA-AM	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo associado à malária
LPS	Lipopolissacarídeo
MAL	*MyD88-adaptor-like*
MC	Malária Cerebral
MCP1	Proteína 1 quimioatrativa de monócito *(Monocyte Chemoattractant Protein-1)*
MIF	Mediana da intensidade de fluorescência
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
MyD88	*Myeloid differentiation primary response gene 88*
MΦ	Macrófago peritoneal
NE	Não Estimulado
NF-KB	Fator de transcrição nuclear kB (*Nuclear Factor-kB*)
NI	Não infectado
NLR	Receptores do tipo Nod (*Nod like receptors*)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos *(Pathogen-associated molecular patterns)*
PaO_2	Pressão parcial de oxigênio arterial
PbA	*Plasmodium berghei* ANKA
PbA-L	*Plasmodium berghei* ANKA-expressando luciferase

PBS	Tampão Fosfato Salino *(Phosphate Buffered Saline*)
PC	Proteína C
Penh	Aumento da pausa respiratória (*enhanced pause*)
Pf	*Plasmodium falciparum*
PfEMP1	*P. falciparum erythrocyte membrane protein-1*
PIF	Altura do pico inspiratório (*peak inspiratory flow*)
RT qRT-PCR	PCR em tempo real (*Real-time quantitative reverse Transcription PCR*)
RANTES	*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA*m*	Ácido Ribonucleico mensageiro
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SDRA-AM	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo associado à malária
sEPCR	Receptor da proteína C endotelial solúvel
TA	Temperatura ambiente
TIR	*Toll/IL-1 receptor*
TIRAP	*TIR-containing adaptor protein*,
TLR	Receptor do tipo tol *(Toll Like Receptor)*
TMB	3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine
TNF	Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
TRAF	*TNF receptor-associated factors*
TRAM	*TRIF-related adaptor molecule*
TRIF	*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule)*
VE-Caderina	Caderina endotelial vascular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
VT	Volume Tidal
vWF	Fator de von Willebrand (*von Willebrand factor)*
WT	*Wild type*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
-/-	Nocaute
®	Marca registrada
µg/ml	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µl/ml	Microlitro por mililitro
µM	Micromolar
CO_2	Dioxido de carbono
g	gramas
h	horas
K	Potássio
mg/Kg	miligrama por quilograma
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	milímetros de mercúrio
MΦ	Macrófago peritoneal
N_2	Gás nitrogênio
ng	nanograma
O_2	Gás oxigênio
ºC	Graus Celsius
pg/mg	picograma por mililitro
pg/ml	picograma por mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
v/v	volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 24

2.1 Malária no Mundo 27

2.2 Malária na América do Sul e no Brasil 28

2.3 Plasmodium e seu ciclo de vida 31

2.4 A resposta imune frente à malária 34

2.5 Malária e suas consequências 39

2.6 Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) 42

2.7 Tratamento para SDRA associado à malaria 46

2.8 Síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária e seus modelos 47

2.9 Citoadesão na malária 50

2.10 Microvasculatura e o endotélio pulmonar 52

3 OBJETIVO 57

3.1 Objetivo geral 57

3.2 Objetivos específicos 57

4 MATERIAIS E MÉTODOS 58

4.1 Animais e parasitas 58

4.2 Comitê de Ética 58

4.3 Parasitemia 58

4.4 Análise da função respiratória 59

4.5 Classificação dos animais em síndrome do desconforto respiratório agudo ou hiperparasitemia 60

4.6 Histologia 61

4.7 Captação da bioluminescência in vivo de eritrócitos parasitados em animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA Luciferase 62

4.8 Isolamento e cultura primária de células endoteliais pulmonares 62

4.9 Caracterização das células endoteliais primárias de pulmões de camundongos DBA/2 63

4.10 Sincronização e enriquecimento dos eritrócitos parasitados 64

4.11 Ensaios com células endoteliais 66

4.12 Ensaio de atividade mitocondrial e viabilidade celular por MTT 67

4.13 Ensaios por citometria de fluxo 68

4.14 Dosagem de VEGF 68

4.15 Ensaio de adesão do *Plasmodium berghei* ANKA em células endoteliais em condições estáticas 69

4.16 Ensaio de adesão do *Plasmodium berghei* ANKA em células endoteliais em fluxo 70

4.17 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real 71

4.18 Quantificação de IL-1β, IL-6, MCP-1, KC e RANTES por CBA 73

4.19 Imunoistoquímica 73

4.20 Obtenção de macrófagos peritoneais 75

4.21 Coleta de neutrófilos da medula óssea 75

4.22 Ensaio de transwell® com células endoteliais e macrófagos peritoneais ou com neutrófilos da medula óssea 76

4.23 Ensaio de Elisa para quantificação de TNF, IL-6, IL-10 e IL-33 77

4.24 Tratamento com dexametasona 78

4.25 Ensaio de permeabilidade vascular pulmonar 79

4.26 Ensaio de permeabilidade por sistema de Transwell® 79

4.27 Identificação dos microfilamentos de actina por imunofluorescência e análise morfométrica das aberturas das junções interendoteliais 80

4.28 Ensaio para neutralização de TNF 81

4.29 Análises estatísticas 82

5 RESULTADOS 83

5.1 Caracterização do modelo murino de síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária.....83

5.1.1 A infecção de camundongos DBA/2 com Plasmodium berghei ANKA leva ao desenvolvimento de SDRA.....83

5.1.2 Eritrócitos parasitados por Plasmodium berghei ANKA acumulam-se nos pulmões e baço de animais com SDRA.....84

5.1.3 Marcação de ICAM, VCAM e CD36 por imunoistoquímica.....87

5.1.4 Dexametasona previne a SDRA associada à malária, mas não altera a sobrevivência em camundongos DBA/2.....90

5.1.5 Dexametasona protege a barreira alvéolo-capilar em camundongos DBA/2 infectados com Plasmodium berghei ANKA.....95

5.2 Caracterização das Células Endoteliais Pulmonares Primárias.....96

5.2.1 Verificação da Atividade Mitocondrial e da Viabilidade Celular.....99

5.2.2 Células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 produzem VEGF.....100

5.2.3 GM-CSF, IL1-β, IL-6, KC, MCP-1 e RANTES são produzidos por células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.....102

5.3 Estudo da citoadesão de eritrócitos parasitados com P. berghei ANKA em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.....112

5.3.1 TNF, extrato do parasita, LPS e VEGF aumentam a citoadesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 112

5.3.2 TNF aumenta a adesão de eritrócitos parasitados com P. berghei ANKA em fluxo.....114

5.3.3 TNF e IFN-γ aumentam a expressão de ICAM-1, VCAM e EPCR em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.....114

5.3.4 Células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2 estimuladas com eritrócitos parasitados de Plasmodium berghei ANKA produzem TNF.....120

5.3.5 Macrófagos e neutrófilos estimulados com eritrócitos parasitados de Plasmodium berghei ANKA promovem a adesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 121

5.3.6 Tratamento com anticorpo neutralizante de TNF diminui a adesão de eritrócitos parasitados.....124

5.3.7 A dexametasona protege a permeabilidade de células endoteliais pulmonares frente aos eritrócitos parasitados de Plasmodium berghei ANKA. 125

6 DISCUSSÃO 127

7 CONCLUSÕES 140

REFERÊNCIAS……...141

1 INTRODUÇÃO

Malária é uma doença infecciosa parasitária de grande impacto para a saúde pública e para o desenvolvimento econômico mundial, pois ainda hoje representa risco para as mais diversas populações, especialmente para aquelas localizadas em áreas tropicais e subtropicais. Esta enfermidade está fortemente associada à pobreza, sendo que as taxas de mortalidade mais altas encontram-se em países com menor PIB per capita (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

De acordo com a organização mundial da saúde (OMS), em 2015, 3,2 bilhões de pessoas estiveram expostas ao risco de ser infectadas e desenvolver a doença e nesse mesmo ano, a estimativa foi de 214 milhões de novos casos. Em 2015 a malária foi responsável pela morte de aproximadamente 438.000 pessoas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Das cinco espécies de *Plasmodium* que infectam humanos, *Plasmodium falciparum* é responsável pelo maior número de casos graves e fatais nos trópicos (OLUPOT-OLUPOT; MAITLAND, 2013). Embora considerada por muito tempo como malária benigna, nos últimos anos as infecções por *P. vivax* também têm sido descritas como causadoras de malária grave, inclusive com casos fatais (NAING et al., 2014).

Acidose e hipolglicemia são os distúrbios metabólicos mais comuns da malária e as principais complicações incluem malária cerebral, comprometimento pulmonar, falências renal e hepática, anemia grave, quadros hemorrágicos, além da malária placentária, as quais podem progredir rapidamente para a morte em horas ou dias. Em muitos pacientes, estas manifestações podem aparecer concomitantemente (MILLER et al., 2013; TRAMPUZ et al., 2003).

Um importante aspecto da patogênese da malária grave resulta na habilidade de eritrócitos parasitados (EP) serem sequestrados na microvasculatura. Este envolvimento pode ser um resultado direto do bloqueio dos vasos sanguíneos ou efeitos causados pela interação entre os EP e o endotélio, incluindo a resposta inflamatória local (HUGHES; BIAGINI; CRAIG, 2010). Além disso, a adesão promove o desaparecimento das formas assexuadas do parasita da circulação periférica, evitando assim, que os mesmos sejam destruídos no baço (GREENWOOD et al., 2008; MILLER et al., 2002; POUVELLE et al., 2000).

Entre as alterações pulmonares causadas pela malária grave, a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) tem sido associada a diferentes enfermidades e não somente em decorrência da malária (LANGE et al., 2012; MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; REISS; UHLIG; UHLIG, 2012; RISCILI et al., 2011).

A SDRA associada à malária (SDRA-AM) pode ocorrer a qualquer momento durante a infecção, incluindo antes, durante ou mesmo após o tratamento com antimaláricos, quando parasitemia já decaiu (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008).

Muitos estudos têm sido realizados desde então para tentar esclarecer os mecanismos de patogênese desta doença. Todavia, apesar das inovações na medicina de tratamento intensivo, em 2005 a incidência estimada de SDRA em adultos foi de aproximadamente 200 mil casos e a mortalidade ainda permanece maior que 40 % (BHARGAVA; WENDT, 2012; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; MATTHAY; ZEMANS, 2011).

A mortalidade por SDRA em hospitais tem sido alta desde que a síndrome foi descrita, atualmente varia entre 40 a 50 % na maioria dos casos e os principais fatores que influenciam na sobrevida incluem idade, tipo de condição médica, gravidade do dano pulmonar, presença de disfunção orgânica extrapulmonar e sepse em curso. A sobrevivência à alta hospitalar é mais baixa em pacientes com sepse grave e pneumonia e maior em pacientes com trauma. Aproximadamente 80 % de todas as mortes ocorrem dentro de 2 a 3 semanas após o aparecimento da síndrome e apenas uma pequena porção de pacientes morrem de hipoxemia (VILLAR; BLANCO; KACMAREK, 2016), sem o suporte ventilatório, a mortalidade é ainda maior, em torno de 80 % (VILLAR; BLANCO; KACMAREK, 2016).

A SDRA é caracterizada por lesão alveolar difusa, inflamação aguda dos alvéolos e do parênquima pulmonar. Observa-se também a perda da função e o aumento da permeabilidade da barreira epitelial do alvéolo e do capilar pulmonar, resultando em edema pulmonar de origem não-cardiogênica, diminuição da capacidade de trocas gasosas, aumento da atividade leucocitária e de mediadores inflamatórios nos pulmões, culminando em insuficiência respiratória em pacientes críticos (ANSTEY et al., 2002; GOODMAN et al., 2003; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

A SDRA-AM pode ocorrer em infecções por *P. falciparum* como uma única complicação ou pode ser acompanhada por outros distúrbios levando a uma disfunção de múltiplos órgãos (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; TAYLOR et al., 2012). A SDRA-AM também já foi descrita em associação às infecções por *P. vivax, P. ovale* e *P. malariae* e também em infecções por *P. knowlesi*, sendo a mais frequente de suas complicações (DESCHEEMAEKER et al., 2009; LEE; MAGUIRE, 1999; MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; PRICE et al., 2007; TAN et al., 2008).

A patogenia da SDRA-AM é multifatorial e, tanto fatores do hospedeiro quanto do parasita, possuem papéis cruciais no desenvolvimento da doença. Embora tenha sido descrita há muito tempo, a mortalidade de pacientes permanece alta nas unidades de terapia intensiva e ainda não se conhece os mecanismos de desenvolvimento da doença. Também são desconhecidas formas de diagnóstico precoce, que permitam um tratamento efetivo antes do estabelecimento da forma grave da síndrome e, que consequentemente, evite a morte do paciente (GOOD et al., 2005; MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008). A mesma pode estar associada a danos do endotélio da microvasculatura pulmonar, ativação de mecanismos pró-inflamatórios, sequestro de parasitas nos pulmões, acidose metabólica, falência cardíaca. (GOOD et al., 2005).

Mecanismos ligados à imunidade inata têm se mostrado importantes para o controle precoce da infecção pelo plasmódio por meio do aumento de citocinas e da ativação da resposta imune celular (ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002; MITCHELL et al., 2005). Entretanto, uma resposta inflamatória excessiva e/ou prolongada contribui para a patogênese e para o aparecimento dos sinais e dos sintomas associados à malária grave, incluindo anemia severa, malária cerebral, pulmonar e placentária (SCHOFIELD, 2007).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Malária no Mundo

Malária é uma doença infecciosa e parasitária que mesmo com os avanços no tratamento e na prevenção ainda resulta em um grande impacto na saúde pública e no desenvolvimento econômico mundial, pois apresenta diversos riscos principalmente nas populações localizadas em regiões tropicais e subtropicais (MIYAKE et al., 2013) (Figura 1).

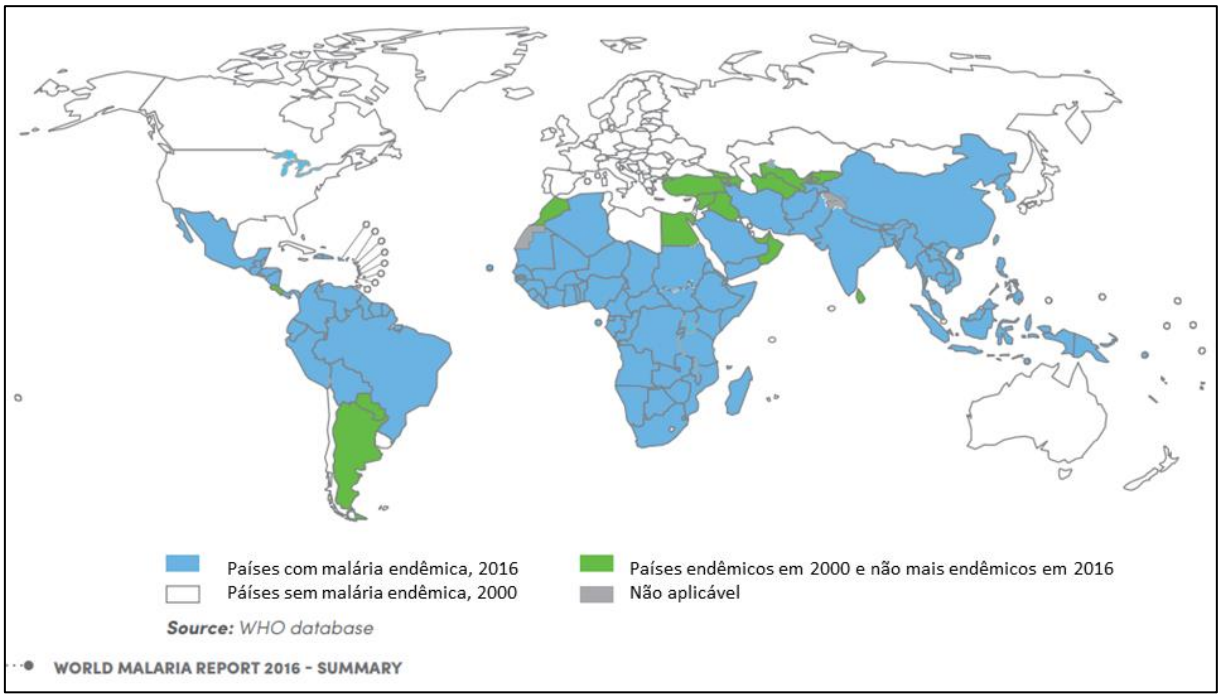

Figura 1 – Distribuição dos países com malária endêmica em 2000 e 2016.
Distribuição dos casos de malária no mundo, mostrando alta incidência da doença em regiões tropicais e subtropicais, especialmente na África Subsaariana. Em 2000 a malária foi considerada endêmica 108 países, caindo para 91 países e territórios em 2016. A maior parte da mudança pode ser atribuído à implantação em grande escala das intervenções de controle da malária. Fonte: Adaptado de (WHO; WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION), 2016).

A doença em humanos é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* eé transmitida através da picada de fêmeas de insetos do gênero *Anopheles*. Atualmente são conhecidas seis espécies do parasito capazes de infectar os seres humanos: *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale* e os plasmódios de primatas não humanos, *Plasmodium knowlesi*

e Plasmodium cynomolgi que, mais recentemente, foram identificados parasitando o homem (AHMED; COX-SINGH, 2015; TA et al., 2014; WHITE, 2008).

Em 2015 foram relatados 212 milhões de casos (faixa de incerteza de 148-304) sendo que 90 % dos casos ocorreram na África, 7 % no sudeste asiático e 2 % na região oriental do mediterrâneo. Embora apenas 4 % do total de casos tenha sido devido a infecções por *P. vivax*, fora do continente africano a proporção de destas infecções foi de 41 % (WHO; WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION), 2016).

Em relação à mortalidade, foi estimada 429.000 óbitos no mundo (faixa de incerteza de 235.000-639.000), sendo que a África foi a região mais afetada (92 %) e 99 % destas mortes foram decorrentes de infecções por *P. falciparum* e 70 % destes óbitos foram em crianças com menos de cinco anos de idade (WHO; WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION), 2016).

2.2 Malária na América do Sul e no Brasil

A maioria dos casos de malaria da América do Sul estão centralizados na região Amazônica; em 2015, quatro paises foram responsáveis por 83 % dos casos de malária nas américas: Brasil (24 %), Venezuela (30 %), Colômbia (10 %) e Peru (19 %) (Figura 2) (RECHT et al., 2017).

Figura 2 - Países da américa do Sul com malária endêmica.
As áreas em verde indicam a região da Floresta Amazônica onde são reportados a maioria dos casos, com exceção da da Colômbia, onde parte dos casos também vem da costa do Pacífico. Fonte: (RECHT et al., 2017).

No Brasil, há três espécies associadas à malária em seres humanos: *P. vivax, P. falciparum* e *P. malariae* sendo *Anopheles darlingi* o principal vetor, cujo comportamento é altamente antropofílico e endofágico (entre as espécies brasileiras, é a mais encontrada picando no interior e nas proximidades das residências). Ele é de ampla distribuição no território nacional, exceto no sertão nordestino, no Rio Grande do Sul e nas áreas com altitude acima de 1.000 metros. É capaz de manter a transmissão mesmo quando há baixa densidade populacional de mosquitos. Esta espécie cria-se, normalmente, em águas de baixo fluxo, profundas, límpidas, sombreadas e com pouco aporte de matéria orgânica e sais. Entretanto, em situações de alta densidade, o *An. darlingi* acaba ocupando vários outros tipos de criadouro, incluindo pequenas coleções hídricas e criadouros temporários (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Os medicamentos antimaláricos são disponibilizados gratuitamente em todo o território nacional, em unidades do Sistema Único de Saúde (SUS). O meio mais efetivo para interromper a cadeia de transmissão e reduzir a gravidade e a letalidade da malária é o diagnóstico, seguido imediatamente de tratamento correto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Na América Latina, a cloroquina (CQ) ainda é muito utilizada para o tratamento dos estágios assexuais na malária não complicada por *P. vivax* (esquizontes), sendo no primeiro dia uma dose de 10 mg/kg e mais dois dias de 7,5 mg/kg; além disso é utilizado o tratamento com primaquina (PQ) por 7 dias (0,5 mg/kg/dia).

Já para a malária por *P. falciparum* na região amazônica foi adotado o tratamento com AL (artemeter + lumenfantrine) + PQ por 1 dia, enquanto na região extra-amazônica o tratamento utilizado é artesunato (AS) + Mefloquina (MQ) + PQ por 1 dia (RECHT et al., 2017).

O tratamento com PQ deve ser utilizado com cautela, pois alguns indivíduos podem apresentar deficiência em G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase), uma enzima que funciona como um protetor crítico do estress oxidativo. O gene que codifica essa enzima é altamente polimórfico resultando em aproximadamente 400 variantes, a maioria devido a mutações que leva a substituições de aminoacidos. O uso de PQ em individuos deficientes em G6PD causa anemia hemolítica aguda (AHA) (RECHT et al., 2017).

No Brasil, cerca de 20 % da população está ameaçada a contrair a malária sendo que foram confirmados 270.000 casos em 2011 embora registrou-se uma queda significativa do número de pessoas padecendo de malária no Brasil, principalmente devido as medidas efetivas de controle. Eram mais de 600.000 casos confirmados em 2000, sendo reduzidos para 270.000 em 2011. Infelizmente o cenário ainda continua bastante preocupante com risco de novas epidemias (LACERDA, 2013).

Entre os casos notificados de malária no Brasil, aproximadamente 99 % ocorrem em estados que compõe a Amazônia Legal (Amazonas, Acre, Amapá, Rondônia, Roraima, Pará, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão). Sabe-se ainda que essa incidência não está distribuída de forma homogênea, sendo influenciada por determinantes epidemiológicos, como o clima, intensa migração da área rural para urbana, que variam em função das formas de ocupação do solo e das modalidades

de exploração econômica dos recursos naturais. Assim estes parâmetros podem aumentar a probabilidade da ocorrência de malária (MEDEIROS et al., 2010) (Figura 3). Ainda nesta região prevalecem características socioeconômicas e ambientais que favorecem a permanência dos plasmódios, tais como a presença de criadouros naturais do vetor e o contato mais aproximado do mosquito com o homem, resultando na forma natural de transmissão da doença (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A precária vigilância epidemiológica e entomológica associado a áreas que sofreram ações antrópicas, como o desmatamento, são fatores que contribuem decisivamente para o agravamento deste quadro (SARAIVA et al., 2009).

2.3 *Plasmodium* e seu ciclo de vida

A designação do termo *"malária"* ocorreu no século XVIII, na Itália e, reflete a crença que predominava de que as febres que estavam associadas à malária eram causadas por vapores venenosos oriundos de pântanos, teoria do *"mau ar"* ou *"male aria"*, em italiano (COX, 2010).

Em 1880, o médico militar francês Charles Louis Alphonse Laveran, trabalhando na Argélia, ao examinar microscopicamente o sangue de um soldado sofrendo de malária, notou entre os glóbulos vermelhos, elementos que pareciam ser parasitas. Após esta observação, ao examinar o sangue de 44 pacientes maláricos, verificou que os mesmos elementos estavam presentes em quase todos. Laveran rapidamente percebeu que tinha encontrado um parasita protozoário que ele chamou de *Oscillaria malariae*. Ele apresentou suas conclusões à Academia Francesa de Ciências Médicas em dezembro 1880, mas não conseguiu convencer nenhum dos eminentes microbiologistas, zoólogos ou malariologistas de que ele estava vendo outra coisa que não fosse células vermelhas do sangue desintegrando-se (COX, 2010). Ainda assim, ele perseverou e por volta de 1884, havia convencido os malariologistas incluindo Bignami, Golgi e Marchiafava que a malária era causada por um protozoário e não por uma bactéria. O seu maior triunfo veio no mesmo ano quando ele convenceu os microbiologistas mais céticos: Louis Pasteur, Charles Edouard Chamberland e Pierre Paul Émile Roux. Em 1895, Laveran ganhou o prêmio Nobel de medicina e em 1907 e suas descobertas foram

descritas mais detalhadamente pelos irmãos Sergent e Bruce-Chwatt. O que foi notável sobre a descoberta de Laveran é que antes dele, nunca havia sido encontrado um protozoário habitando qualquer tipo de célula do sangue humano. Depois de suas descobertas, muitos outros trabalhos vieram e em 1890, sabia-se que a malária era causada por um protozoário que invadia e se multiplicava em hemácias. Era um momento de muita confusão, pois havia três espécies identificadas com periodicidades específicas e outras características. Eram elas, *Haemamoeba vivax*, *Laverania malariae* e *Haemamoeba malariae* agora, respectivamente, *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Em 1918, John Stephens, trabalhando na África Ocidental, descobriu uma quarta espécie que era parecido com *P. vivax*, que ele descreveu como *P. ovale* em 1922 (COX, 2010).

O que se sabe hoje em dia sobre o ciclo de vida do *Plasmodium* sp. é que o mesmo é complexo e inicia-se quando uma fêmea infectada do mosquito do gênero *Anopheles,* ao realizar o seu repasto sanguíneo, introduz esporozoítos infectantes na pele do hospedeiro vertebrado. Estes esporozoítos permanecem na pele por cerca de 15 minutos e podem alcançar os capilares sanguíneos, devido da sua mobilidade ou, penetram nos vasos linfáticos, enquanto outros permanecem na pele e morrem (NEVES, 2005).

Carregados pela circulação sanguínea, eles atingem o fígado onde são capazes de atravessar células de Kupffer (PRADEL; FREVERT, 2001) e invadem diversos hepatócitos, até finalmente, estabelecerem-se em um deles (MOTA et al., 2001). Neste hepatócito infectado, os esporozoítos diferenciam-se em trofozoitos pré-eritrocíticos e multiplicam-se por reprodução assexuada do tipo esquizogônia, dando origem aos esquizontes teciduais (forma exo-eritrocítica). Esta etapa é assintomática e conhecida como fase pré-eritrocítica ou fase hepática (NEVES, 2005).

Posteriormente, os merozoítos são lançados na corrente sanguínea por meio de vesículas denominadas merossomas. Estas se rompem liberando os merozoítos, que por sua vez invadem eritrócitos, iniciando o ciclo intra-eritrocítico assexuado, responsável pela manifestação dos sinais e dos sintomas da enfermidade (STURM et al., 2006).

Os parasitas desenvolvem-se dentro do vacúolo parasitóforo, onde se alimentam de hemoglobina, levando a formação do pigmento malárico ou hemozoína e passa por vários estágios. O primeiro estágio é chamado de anel e,

após ter seu citoplasma aumentado, transformam-se em trofozoítos. Estes se transformarão em esquizontes através de um processo de divisão celular denominado esquizogonia, levando a consequente formação de novos merozoítos. Após a ruptura dos eritrócitos, estes são liberados na circulação sanguínea e invadem novos eritrócitos, dando continuidade ao ciclo e à manifestação da doença (NEVES, 2005). A ruptura dos esquizontes é seguida pela aparição da febre característica da doença. (ANTINORI et al., 2012).

Após algumas gerações de merozoítos, alguns parasitos não iniciam o processo de divisão celular e diferenciam-se nas formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos. Estes não sofrem mais divisão celular e seguirão o seu desenvolvimento no mosquito, após serem ingeridos pelo inseto vetor no momento do repasto sanguíneo. Ao alcançarem o trato digestivo do inseto, as hemácias são digeridas e os gametócitos são liberados. A fecundação entre os gametas masculino e feminino forma o zigoto, que se diferencia em oocineto. O oocineto forma um envoltório protetor transformando-se em oocisto, que sofre a primeira meiose redutora, seguida de inúmeras mitoses, liberando os esporozoítos haplóides na hemolinfa do inseto. Estes esporozoítos migram e instalam-se na glândula salivar do mosquito, até que se realize uma nova alimentação sanguínea em um hospedeiro vertebrado, podendo infectar um novo indivíduo (NEVES, 2005) (Figura 3).

Infecções por *P. ovale,* assim como *P. vivax,* ainda apresentam algumas formas que podem ficar em estado de latência no hepatócito, sendo chamados de hipnozoítos (do grego *hipnos*, sono). Estas formas levam a recaídas da doença após períodos de incubação que, em geral, são de seis meses (HULDEN; HULDEN, 2011).

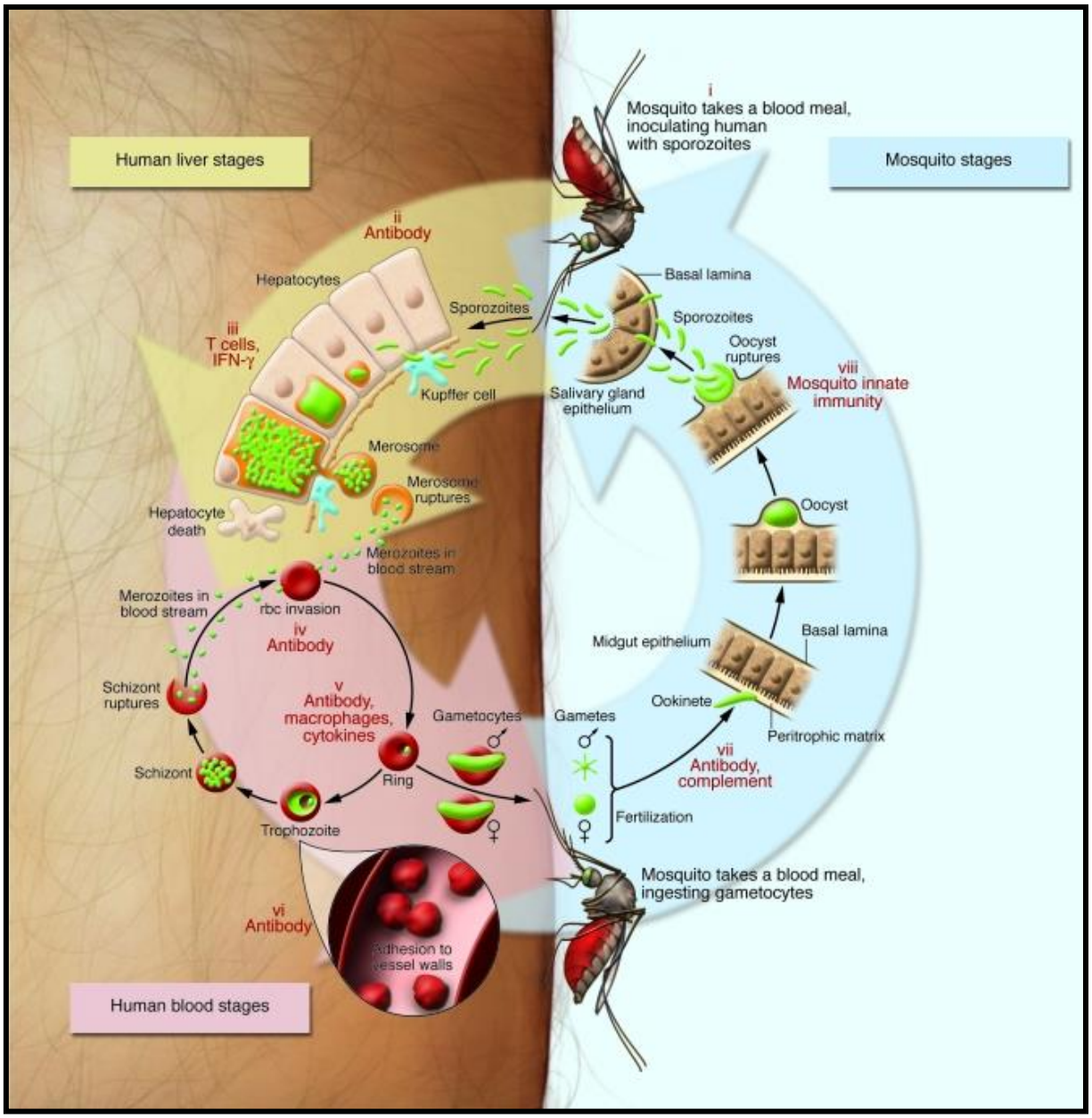

Figura 3 - Ciclo de vida do *Plasmodium sp*.
Parasitas na forma de esporozoítos são inoculados na pele do ser humano pela picada do mosquito vetor. Os parasitas seguem para o fígado iniciando a fase hepática e posteriormente, migram para sangue, originando a fase eritrocítica, onde se observa o quadro sintomatológico. Fonte: Greenwood et al., 2008).

2.4 A resposta imune frente à malária

O ciclo de vida do parasita, conforme detalhado anteriormente, compreende diferentes estágios e em cada um deles o plasmódio pode ser alvo do sistema imune. Esporozoítos na derme precisam evadir dos anticorpos antes de alcançar os vasos sanguíneos; no fígado encontram-se suscetíveis a ação das células de

Kupffer e no interior dos hepatócitos, os esporozoítos estão suscetíveis à ação de células T citotóxicas. Merozoítos na circulação estão expostos à ação dos anticorpos antes de conseguirem atingir e invadir os eritrócitos e mesmo durante o estágio intra-eritrocítico, estão sujeitos a opsonização por anticorpos e a ação de macrófagos (GREENWOOD et al., 2008).

Células do sistema imune inato são as primeiras a reconhecer patógenos humanos, tais como o plasmódio, seja ele na forma de esporozoíto ou como merozoíto eritrocítico. Este reconhecimento acontece através de macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células natural killer (NK), TCRγδ^{+} e proteínas do complemento. Além disso, há também a liberação de citocinas, que potencializam a fagocitose, atraem novas células inflamatórias e contribuem para a ativação de células TCD4^{+} (HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI, 2011; LUNDIE, 2011; STEVENSON; RILEY, 2004).

O principal mecanismo de defesa contra protozoários que sobrevivem dentro dos macrófagos é a imunidade mediada por células, particularmente a ativação do macrófago por citocinas derivadas das células T_H1. A interleucina (IL)-12 acentua a produção de IFN-γ e o desenvolvimento de células T_H1 (BOSTROM et al., 2012).

As citocinas inflamatórias têm um papel importante na resposta imune a infecções, mas também podem contribuir com a imunopatologia e a severidade da doença, caso seus níveis não estejam devidamente controlados. Sabe-se que a rápida produção de IFN-γ é essencial para montar resistência perante a infecção e gerar proteção para episódios clínicos. No entanto, outras citocinas pró-inflamatórias como Interleucina 12 (IL-12) e TNF também possuem um papel mediador essencial nesta proteção. Todos eles parecem ser necessários para inibir o crescimento do parasita e para a estimulação da fagocitose com objetivo de eliminar os eritrócitos parasitados.

Na malária, as células TCD8^{+} estão centralmente envolvidas na imunidade protetora contra o parasita na fase hepática. Em estudos realizados com os parasitas murinos *P. berghei* e *P. yoelli*, a transferência adotiva de clones de células TCD8^{+} específicas para os epítopos localizados nas proteínas circunsporozoíticas (CS), as quais recobrem os esporozoítos, protegeu os camundongos contra o desafio com estes parasitas. Além disso, a imunização de camundongos com uma vacina expressando estes epítopos, induziu a produção de células TCD8^{+}, o que

inibiu fortemente o desenvolvimento do parasita no estágio hepático *in vivo* (CARVALHO et al., 2002).

Células de Kupffer ativadas produzem IL-18 e esta citocina tem potencial de ativar a resposta inflamatória através da indução da produção de IFN-γ, impedindo, por sua vez, o crescimento de esporozoítos dentro deste órgão (TSUTSUI et al., 2003). Há indícios de que células $TCD4^+$ são essenciais para o desenvolvimento de células $TCD8^+$ que podem inibir o desenvolvimento da malária na fase hepática e a citocina IL-4 é um mediador essencial para essa interação da célula T (CARVALHO et al., 2002).

A imunidade protetora ao plasmódio no estágio sanguíneo requer tanto elevados títulos de anticorpos neutralizantes quanto células $TCD4^+$ específicas contra a malária para um rápido e eficaz controle da parasitemia, sendo os principais alvos antigênicos do reconhecimento humoral as proteínas do *P. falciparum* PfEMP1 (sigla proveniente do inglês "*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*") (LUNDIE, 2011). Os eritrócitos parasitados induzem a produção de fator de necrose tumoral (TNF), IL-12 e IFN-γ pelas células mononucleares sanguíneas (HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI, 2011).

O TNF é uma citocina pró-inflamatória que tem papel muito importante na imunidade de mamíferos e na homeostase celular. A desregularização do receptor do TNF (TNFR) está associada a muitos distúrbios inflamatórios, incluindo vários tipos de artrite e doença inflamatória intestinal, dessa maneira o acesso ao TNF tem sido uma estratégia terapêutica eficaz nessas doenças (BRENNER; BLASER; MAK, 2015). Níveis plasmáticos de TNF e óxido nítrico, secretados por macrófagos e neutrófilos ativados estão associados com a febre e remoção dos parasitas.

O aumento da produção de citocinas inflamatórias como TNF, IL-1 e IFN-γ aumentam a expressão de moléculas de adesão, incluindo ICAM-1 (CD54), CD36 e trombospodina no endotélio vascular dos principais órgãos do corpo, incluindo o cérebro. Essas moléculas estão envolvidas na patogênese da malária cerebral (MC) humana e experimental. Alta expressão de TNF e ICAM-1 em cortes de cérebro foram visto não apenas em células endoteliais vasculares, mas também em leucócitos e parasitas em lesões positivas para MC (HEARN et al., 2000). A observação de que níveis mais elevados de TNF foram encontrados em pacientes com malária grave e que essa citocina regula a expressão de ICAM-1 em células

endoteliais, sugeriu o envolvimento de ICAM-1 na gravidade da malária (SHERMAN; EDA; WINOGRAD, 2003).

Nos macrófagos de camundongos, a ativação de receptores do tipo toll (TLR, do inglês "*Toll-like Receptors*") induz a produção de óxido nítrico e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1β. Nas células endoteliais vasculares umbilicais humanas, a ativação de TLR por âncoras GPI induz a expressão de ICAM-1, molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e E-selectina, bem como a produção de óxido nítrico (GAZZINELLI et al., 2014).

TNF tem demonstrado um papel importante na patogênese da malária por *P. falciparum*. Polimorfismos no promotores (TNF-238) associado à atividade diferencial e à produção de TNF, estão associado ao desfecho clínico grave da malária por *P. falciparum* em crianças de Ibadan, sudoeste da Nigéria (OLANIYAN et al., 2016).

Outras citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 têm sido implicadas na patogênese da malária grave quando comparados com malária não complicada (BOSTROM et al., 2012; GOODMAN et al., 2003).

Em resposta aos ligantes do parasita reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrão, como os Toll-like receptors (TLRs) e CD36 ou citocinas inflamatórias, como IFN-γ, as células dendríticas (DC) amadurecem e migram para o baço, o primeiro local da resposta imune no estágio sanguíneo contra o plasmódio. A maturação de células dendríticas está relacionada ao aumento da regulação de moléculas de MHC classe II, CD40, CD80, CD86, moléculas de adesão e produção de citocinas incluindo IL-12. A IL-12 ativa NK a produzir IFN-γ e induz a diferenciação em células T helper 1 (T_H1). A produção de citocinas, particularmente IFN-γ, por células NK resulta na maturação de células dendríticas e aumenta o efeito do estímulo decorrente do parasita, facilitando a expansão clonal de $TCD4^+$ específicas contra o antígeno. A citocina IL-2, produzida por células T_H1 antígeno-específicas, estimula as células NK a produzir IFN-γ, que induz a maturação de DC e macrófagos ativados que, por sua vez, amplificam a resposta imune (STEVENSON; RILEY, 2004).

Receptores para padrões moleculares (PRR, do inglês *"Pattern Recognition Receptors*") desempenham um papel crítico na detecção de patógenos e na ativação da resposta imune inata (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Receptores de membranas TLRs e receptores citosólicos do tipo Nod (NLR, do inglês "*Nod-like*

Receptors") representam duas importantes famílias receptores nas células do hospedeiro induz à ativação de uma cascata de sinalização, que envolvidas no reconhecimento e na ativação de respostas inflamatórias frente aos diferentes produtos microbianos (ADEREM; ULEVITCH, 2000; FRITZ et al., 2006). Desta forma, a estimulação destes culmina na transdução de sinais, como do fator de transcrição nuclear κB (NF-κB, do inglês *"Nuclear Factor – κB"*) e, consequentemente, na produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas (AREND; PALMER; GABAY, 2008; FRITZ et al., 2006; MEDZHITOV, 2001).

Atualmente já foram identificados treze membros desta família de receptores em mamíferos, sendo dez em humanos (TLR1 – TLR10) e doze em camundongos (TLR1 – TLR9 e TLR11 – TLR13) (GAY; GANGLOFF, 2007). Sendo seis extracelulares (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10), localizados na superfície da membrana plasmática das células, e sete intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13), presentes na membrana de endossomos (KAWASAKI; KAWAI, 2014; O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013).

Na malária, os receptores TLRs têm sido correlacionados com o reconhecimento da hemozoína (Hz) e de Glicosilfosfatidilinositol (GPI) presentes nos plasmódios (COBAN et al., 2005; KRISHNEGOWDA et al., 2005; PARROCHE et al., 2007; PICHYANGKUL et al., 2004). GPIs purificados de culturas de *P. falciparum* são reconhecidos por TLR2 e, menos extensivamente, por TLR4 (KRISHNEGOWDA et al., 2005). Já foi demonstrado que o pigmento malárico, tanto Hz purificada de *P. falciparum* quanto Hz sintética, estimula a resposta imune *in vivo* e *in vitro* através da ativação de TLR9, resultando na produção de citocinas e quimiocinas e no aumento da expressão e da regulação de moléculas co-estimuladoras (COBAN et al., 2005). Foi também sugerido em um modelo murino de SDRA associado à malária grave, que a hemozoína induz inflamação pulmonar e que a mesma está associada à SDRA, aumentando a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (DEROOST et al., 2013).

Embora a resposta imune ao plasmódio deva ser eficiente, e contar com componentes pró-inflamatórios, que controlam ou eliminam eritrócitos infectados, esta resposta deve ser suprimida por mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e TGF-β, a partir do momento em que a carga parasitária esteja controlada, evitando assim, danos ocasionados pela própria resposta amplificada, podendo levar ao quadro de malária grave (RILEY et al., 2006; STEVENSON; RILEY, 2004). Já foi

demonstrada uma correlação entre a gravidade da doença e níveis circulantes de citocinas (POOVASSERY; MOORE, 2009).

Indivíduos que apresentaram vários episódios de malária podem atingir um estado de imunidade parcial, com quadro subclínico ou assintomático, contudo uma imunidade esterilizante, que confere total proteção clínica, até hoje não foi observada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Portanto, a resposta imunológica frente à malária é complexa e específica para cada estágio da infecção e a resposta imune exacerbada pode levar as síndromes de malária grave.

2.5 Malária e suas consequências

O período de incubação da malária varia de acordo com a espécie de plasmódio. Para *P. falciparum*, de 8 a 12 dias; *P. vivax*, 13 a 17; e *P. malariae*, 18 a 30 dias. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos originam formas evolutivas do parasito denominadas hipnozoítos, que podem permanecer em estado de latência no fígado. Estes hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis, em geral dentro de 3 a 9 semanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A crise aguda da malária, que ocorre na fase sanguínea, caracteriza-se por episódios de calafrios, febre (que pode atingir 40 ºC ou mais) e sudorese com duração que pode variar de 6 a 12 horas e, em geral, esses sintomas são acompanhados por cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos. Após as primeiras manifestações, a febre pode passar a ser intermitente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

O quadro clínico da malária é variável e depende de alguns fatores como a espécie de parasita, a quantidade de parasitas circulantes, o tempo de doença e o nível de imunidade adquirida pelo paciente, sendo que gestantes, crianças e primoinfectados estão sujeitos a maior gravidade da doença. O diagnóstico precoce e o tratamento correto e oportuno são os meios mais adequados para reduzir a gravidade e a letalidade da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

P. falciparum é a espécie mais virulenta, responsável pela febre terçã maligna caracterizada pelos acessos febris em intervalos de 36 a 48 horas. Esta espécie é

responsável pela maioria das mortes causadas pela malária (GARCIA; MARKUS; MADEIRA, 2001). Algumas complicações comumente são encontradas em suas infecções, tais como: acidose metabólica, malária cerebral, anemia severa, distúrbios hepáticos e renais e complicações pulmonares, conhecidas como síndrome do desconforto respiratório agudo (MILLER et al., 2002).

A característica fundamental da patogênese relacionada a esta espécie é a adesão de eritrócitos infectados às células endoteliais da microvasculatura de órgãos como cérebro, e células epiteliais da placenta, devido a presença de receptores específicos encontrados nestes, como CD36 e CSA. Isto resulta em um baixo fluxo sanguíneo e incita o processo inflamatório, com infiltração de células inflamatórias e liberação de mediadores pró-inflamatórios, causando alterações tissulares que caracterizam as formas graves da doença (GREENWOOD et al., 2008; MILLER et al., 2002; POUVELLE et al., 2000).

O fenótipo de adesão de eritrócitos infectados está correlacionado ao aparecimento de PfEMP1 na superfície do eritrócito parasitado. Essa proteína é codificada por genes da diversa família de *var*, a qual permite a ligação do eritrócito parasitado a vários receptores promovendo o desaparecimento das formas assexuadas do parasita da circulação periférica evitando provavelmente assim, que os mesmos sejam destruídos no baço (MILLER et al., 2002; POUVELLE et al., 2000).

A proteína PfEMP1 interage com uma série de receptores de superfície como ICAM-1, PECAM-1, CD36, entre outros, e esta interação está relacionada com a patogênese da malária cerebral (MC) (RÉNIA et al., 2012).

A MC é uma forma bastante grave observada em infecções por *P. falciparum* com manifestações que incluem coma por mais de 30 minutos; caso não seja tratada, é quase sempre fatal, e mesmo quando realizado o tratamento adequado, a taxa de mortalidade é de aproximadamente 20 % em adultos e 15 % em crianças (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012).

Contudo, atualmente, acredita-se que na gênese da MC, estão envolvidos, além do sequestro do eritrócito infectado, a inflamação e a homeostasia, levando a disfunção da microcirculação (VAN DER HEYDE et al., 2006).

Também já foi demonstrado o sequestro de eritrócitos parasitados na placenta, sendo que os mesmos ligam-se a condroitina sulfato A (CSA), causando malária placentária e, consequentemente, nascimento prematuro e baixo peso ao nascer,

resultando no aumento da mortalidade dos recém-nascidos, bem como em anemia materna (MILLER et al., 2002).

Outra complicação frequentemente observada na malária é a anemia severa, definida por níveis de hemoglobina < 5 g/dL ou hematócrito <15 %. Em áreas de alta endemicidade, a anemia grave é um problema sério, especialmente em crianças e em mulheres grávidas, (especialmente em primíparas), mas pode ocorrer também na população adulta (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012). Os mecanismos são multifatoriais, incluindo hemólise de eritrócitos infectados e não infectados, resposta inapropriada da medula óssea e outros fatores individuais (por exemplo, bacteremia, HIV, ancilostomíase, deficiência de G6PD, vitamina A e deficiência de vitamina B12). (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012). Alguns estudos indicam uma associação entre a anemia severa e altos níveis de TNF, IL-10 e monócitos circulantes contendo hemozoína (LUTY et al., 2000).

Falência renal aguda pode estar presente na admissão do paciente em um contexto envolvendo múltiplos órgãos, ou pode ocorrer na fase de recuperação da malária grave (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012). A doença ocorre quase exclusivamente em adultos ou em crianças mais velhas com uma incidência de 1 a 4 %. A patogênese é multifatorial e envolve a interação de fatores mecânicos, imunológicos, citocinas e fatores humorais; o sequestro do parasita na microvasculatura causa prejuízo no fluxo da microcirculação renal e no metabolismo. Outros fatores também podem estar associados, como a ativação massiva de monócitos e a liberação de espécies reativas de oxigênio (KRISHNA et al., 2012).

Já as infecções por *P. vivax* são caracterizadas pela febre terçã benigna, com acessos febris em intervalos de 48 horas. Apesar de ser conhecida como malária benigna, trabalhos demonstraram a ocorrência de malária grave, como a lesão pulmonar aguda e MC associada à infecções por este parasita (BOULOS; COSTA; TOSTA, 1993; OZEN et al., 2006; TAN et al., 2008). Lacerda e colaboradores em 2012 descreveram casos de paciente na região Amazônica brasileira, infectados com *P. vivax* e que vieram a óbito com malária grave. Dentre estes casos a maior parte foi em decorrência de SDRA, apresentando edema pulmonar associado ao acúmulo de neutrófilos no espaço interalveolar (LACERDA et al., 2012).

Atualmente, há evidências de que ocorra aderência dos eritrócitos infectados *P. vivax* (formas maduras) às células endoteliais, pelo receptor ICAM-1 (DE LAS

SALAS et al., 2013), e pelo receptor CSA, na placenta (CHOTIVANICH et al., 2012), o que pode ser envolvido da patogenicidade desta espécie de parasita.

Porém, no Brasil, o número de admissões hospitalares por *P. falciparum* reduziu de 5.396 em 2000 para 697 em 2012 e em 2015 passou para 288. Essa redução pode ser atribuída às melhorias no sistema de saúde, especialmente da região amazônica. Já a proporção de admissões por *P. vivax* permaneceu baixa de 2000 a 2006 (1 %), diminuindo para 0,73 % em 2007 e 2008 e apresentou um pico em 2011, atingindo 1,5 % (Figura 4). Esse aumento pode ser atribuído ao número de casos de malária grave ou, a administração de primaquina sem a análise prévia de deficiência de G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase) (SIQUEIRA et al., 2016).

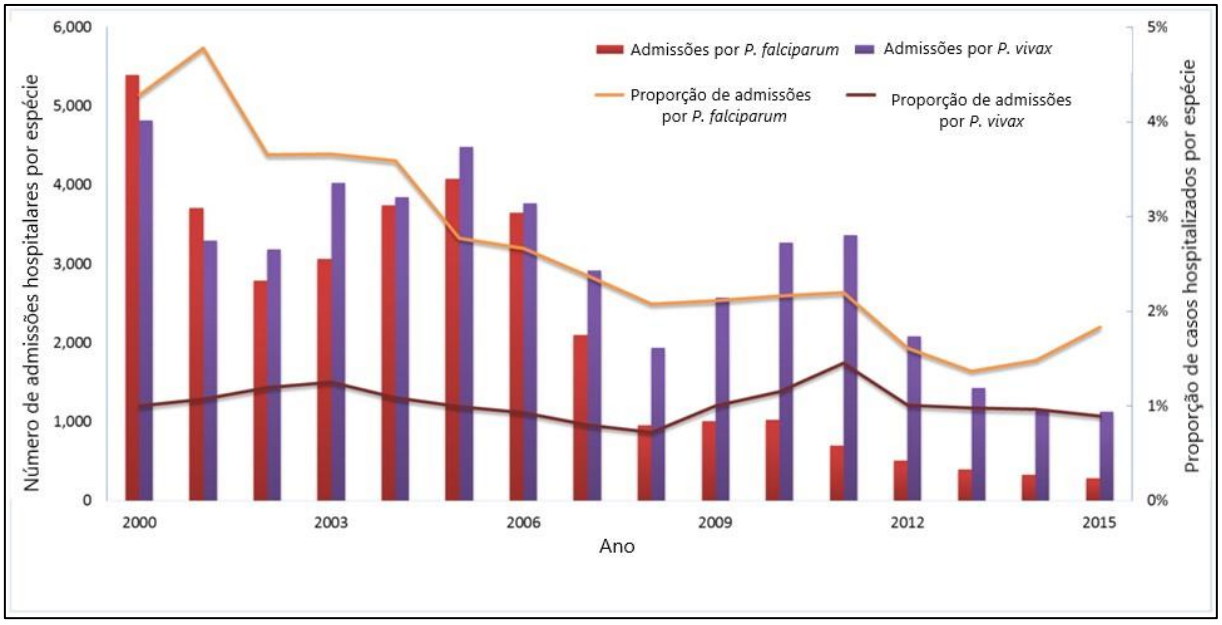

Figura 4 - Número e proporção de admissões hospitalares no Brasil.
Gráfico correspondente a infecções por *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax,* no período de 2000 a 2015. Fonte: Adaptado de (SIQUEIRA et al., 2016).

2.6 Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA)

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo foi pela primeira vez reportada em 1967 por Asbaugh e colaboradores, sendo descrita como desconforto respiratório agudo em adultos. Nesta ocasião o quadro relatado foi dispneia severa, taquipnéia, cianose, diminuição da complacência pulmonar, infiltrado inflamatório alveolar difuso e dos doze pacientes observados, sete foram a óbito (ASHBAUGH et al., 1967).

Desde então, a incidência desta síndrome, especialmente nos Estados Unidos, tem aumentado e, nos últimos anos foram registrados cerca de 200.000 casos por ano e a taxa de mortalidade é significativa, em torno de 40 % (HAN; MALLAMPALLI, 2015; RUBENFELD et al., 2005). Esta doença tem sido associada a diferentes enfermidades e pode ocorrer através de insultos diretos ou indiretos, tais como: pneumonia, aspiração ou inalação de conteúdo gástrico, traumas, septicemia, queimaduras graves, inalação de fumaça e, mais recentemente, a infecções pelo vírus H1N1, além da malária grave (LANGE et al., 2012; MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; REISS; UHLIG; UHLIG, 2012; RISCILI et al., 2011).

A SDRA é uma síndrome caracterizada por lesão alveolar difusa, inflamação aguda dos alvéolos e do parênquima pulmonar. Observa-se também a perda da função e o aumento da permeabilidade da barreira epitelial do alvéolo e do capilar pulmonar, resultando em edema pulmonar de origem não-cardiogênica, diminuição da capacidade de trocas gasosas, aumento da atividade leucocitária e de mediadores inflamatórios nos pulmões, culminando em insuficiência respiratória em pacientes críticos (ANSTEY et al., 2002; GOODMAN et al., 2003; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

Em 1994, um consenso Americano-Europeu estabeleceu critérios para definir Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). Ambas, apresentam início agudo, infiltrado bilateral observado em radiografia torácica e edema de origem não cardiogênica. Entretanto, para LPA foi determinada a razão de PaO_2/FiO_2 ≤300 e para a SDRA, sua forma mais severa, a razão PaO_2/FiO_2 foi ≤ 200 (WALKEY et al., 2012).

Mais recentemente, em 2012, foi realizada uma nova conferência que resultou na definição de Berlim. As principais alterações em relação a definição anterior foram: a eliminação do termo lesão pulmonar aguda (LPA) e a classificação da Síndrome do desconforto respiratório agudo em três níveis (Leve: PaO_2/FiO_2 = 201-300; Moderado: 101-200 e Grave: <100). Além disso, foi definido o início agudo como ≤ 7 dias após a injúria inicial, edema de origem não cardiogênica ou sobrecarga de fluídos e radiografia apresentando opacidades bilaterais, não totalmente explicadas por derrames, colapso lobar/ pulmão ou nódulos (WALKEY et al., 2012).

Dessa maneira, neste trabalho adotamos o termo SDRA para idenficar os animais que vão à óbito entre o 7º e o 12º dia pós-infecção com efusão pleural e que

desenvolvem lesões pulmonares compatíveis com SRDA humana, tais como: alteração dos parâmetros respiratórios, hipoxemia e opacidade pulmonar, infiltrado leucocitário e presença de membrana hialina conforme descrito anteriormente (ORTOLAN et al., 2014).

Na fase inicial da SDRA, conhecida como fase exsudativa, tanto agressões diretas, como indiretas resultam em lesão do endotélio capilar e do epitélio pulmonar, levando a morte de pneumócitos tipo I e pneumócitos tipo II. Os pneumócitos tipo I constituem a vasta maioria da superfície alveolar e são particularmente susceptíveis a lesões. Como consequência de um dano do endotélio capilar e do epitélio, há uma perda da função da barreira alvéolo-capilar, o que contribui para o acúmulo de um fluído proteináceo (edema) tanto no interstício pulmonar quanto no interior dos alvéolos, resultando na formação de membrana hialina. Ocorre também sequestro, marginação e, consequente, aumento do número de neutrófilos em ambos os espaços intersticiais e alveolares, que colaboram para a injúria. Na segunda fase, a fibroproliferativa, ocorre hiperplasia de pneumócitos tipo II, que se proliferam com o objetivo de repor os pneumócitos tipo I, que sofreram necrose ou apoptose, e também há proliferação de fibroblastos e miofibroblastos. Nesta fase, ocorre também exacerbação da inflamação e os alvéolos podem estar colapsados devido à diminuição do surfactante (produzidos por pneumócitos tipo II), além do espessamento da membrana hialina e da fibrose (DENG; STANDIFORD, 2011; JAIN; BELLINGAN, 2007; MATTHAY; ZEMANS, 2011).

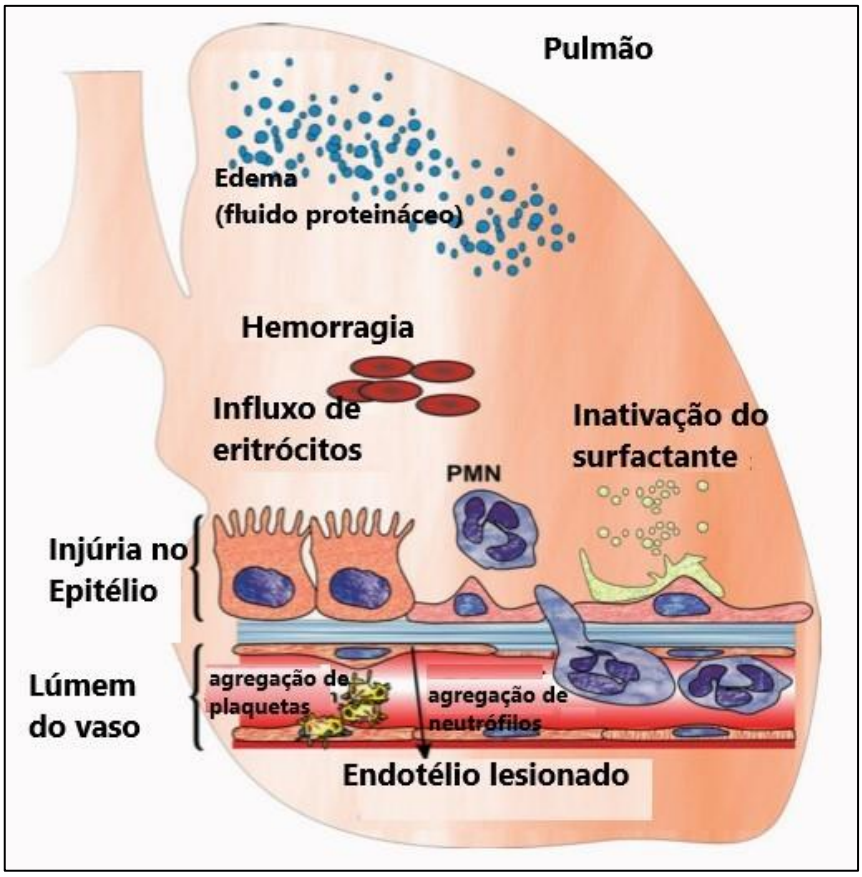

Figura 5 - Fase exsudativa da síndrome do desconforto respiratório agudo.
Nesta fase ocorre dano no endotélio capilar e no epitélio pulmonar, aumento da permeabilidade vascular, levando a formação do edema, inativação da substância surfactante, influxo de polimorfonucleares (PMN) e hemorragias. Fonte: Adaptado de (FUDALA et al., 2010).

Há indícios de que citocinas pró-inflamatórias em conjunto com quimiocinas possuem um importante papel na amplificação, mediação e perpetuação do processo da lesão pulmonar (GOODMAN et al., 2003). Estudos já demonstraram o grande envolvimento dos neutrófilos na SDRA, especialmente no início da resposta inflamatória, contribuindo para os danos aos pulmões. Edema pulmonar, injúrias endotelial e epitelial são acompanhadas pelo influxo de neutrófilos para o interstício e para o espaço broncoalveolar. As quimiocinas descritas no recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação são CXCL1 (em camundongos: KC), CXCL2 (MCP-1), CXCL5 (ENA-78), CXCL15 (*lungkine*) (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; PUNEET; MOOCHHALA; BHATIA, 2005), e CCL2 (MIP-2) (ROSE; SUNG; FU, 2003) que podem estar envolvidas na patogenia da SDRA-AM.

2.7 Tratamento para SDRA associado à malaria

A malária grave pode matar dentro de horas da apresentação, especialmente em crianças. O diagnóstico rápido por microscopia ou teste de diagnóstico rápido e início precoce do tratamento antimalárico são cruciais. As drogas orais eficazes, principalmente um tratamento combinado baseado em artemisinina, são administradas uma vez que os pacientes podem engolir normalmente. O artesunato é a droga de escolha para adultos, mulheres grávidas e crianças. Grandes ensaios randomizados mostraram redução de 35 % e 22 % nas taxas de mortalidade em adultos e crianças, respectivamente, em comparação com a quinina (TAYLOR et al., 2012).

Não há tratamentos específicos para SDRA na malária, de modo que as estratégias de manejo seguem as diretrizes da SDRA não associadas à malária. A ventilação mecânica é freqüentemente difícil no pulmão gravemente doente. As diretrizes incluem a aplicação de ventilação de suporte ao volume ou à pressão com pressão expiratória final positiva. A intubação de sequência rápida deve ser feita para prevenir a hipercapnia com subsequente aumento da pressão intracraniana. Em muitos centros, a reversão da razão inspiração-expiração é utilizada como estratégia em caso de hipoxemia refratária. Colocar o paciente na posição pronada pode melhorar drasticamente a oxigenação, embora uma aplicação sistemática desta estratégia não tenha conseguido melhorar a mortalidade em um estudo randomizado em pacientes com SDRA não relacionada com a malária (TAYLOR et al., 2012).

A maioria dos pacientes que chegam às unidades de saúde apresentando SDRA recebe ventilação mecânica. O objetivo é promover troca gasosa, evitando a lesão pulmonar associada à este procedimento e o comprometimento hemodinâmico. Entretanto, uma ventilação inadequada pode causar piora no quadro do paciente, estimulando o pulmão a produzir mediadores inflamatórios em resposta ao estresse mecânico (BARBAS VALENTE et al., 2007).

Uma outra estratégia utilizada é a manobra de recrutamento, esta utiliza um aumento dinâmico e transitório da pressão transpulmonar (diferença entre as pressões nas vias aéreas e pleural) para abrir áreas do pulmão; esta estratégia pode melhorar a dinâmica pulmonar e a oxigenação, entretanto pode aumentar

temporariamente a permeabilidade alvéolo-capilar. Dessa maneira, não está bem estabelecido a eficácia desta estratégia no tratamento da SDRA (SILVA; PELOSI; ROCCO, 2016).

2.8 Síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária e seus modelos

A SDRA-AM já foi descrita em infecções por *P. faciparum, P. vivax, P. ovale e P. malariae* e mais recentemente por *P. knowlesi* (DESCHEEMAEKER et al., 2009; LEE; MAGUIRE, 1999; MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; PRICE et al., 2007; TAN et al., 2008).

Embora tenha sido descrita há muito tempo, a mortalidade de pacientes permanece alta nas unidades de terapia intensiva e não se conhece os mecanismos de patogênese e formas de diagnóstico precoce que permitam um tratamento efetivo antes do estabelecimento da forma severa da síndrome, e que consequentemente, evite a morte do paciente (GOOD et al., 2005; MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008). A SDRA associada à malária devido ao *P. falciparum* ocorre em mais de 25 % dos adultos e 40 % das crianças entre os casos de malária grave. Ainda, a doença pode ocorrer como uma única complicação ou pode ser acompanhada por outros distúrbios levando a uma disfunção de múltiplos órgãos (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; TAYLOR et al., 2012).

A SDRA-AM pode estar associada a injúrias no endotélio da microvasculatura pulmonar, ativação de mecanismos pró-inflamatórios, sequestro de parasitas nos pulmões, acidose metabólica, falência cardíaca (GOOD et al., 2005).

Por diversas razões, é bastante difícil investigar a resposta imune humana contra os parasitas da malária *in vivo*, pois há, por exemplo, restrições para a coleta de tecido pulmonar e análise até mesmo por questões éticas. Portanto, modelos animais têm sido cada vez mais utilizados para estudar aspectos fisiopatológicos e imunológicos da SDRA, funcionando como importantes pontes entre os pacientes de uma zona endêmica e o laboratório de pesquisa, uma vez que hipóteses emergentes de estudos humanos podem ser facilmente testadas em modelos animais e fornecem valiosas informações sobre a patogenia das enfermidades.

Desta maneira, espécies de *Plasmodium* que infectam roedores são frequentemente utilizados como modelos experimentais para a malária humana e, diferentes combinações entre espécies de *Plasmodium* murinos (*P. berghei, P. yoelii e P. chabaudi*) e linhagens de camundongos permite-nos estudar um número de manifestações fisiopatológicas (LOVEGROVE et al., 2008; PAMPLONA et al., 2009; VAN DEN STEEN et al., 2010).

Assim, estes modelos têm sido muito importantes para a compreensão dos mecanismos da patogênese da malária, elucidar as interações imunes em hospedeiros e para demonstrar muitos fatores associados aos mecanismos de defesa contra a malária, como os modelos desenvolvidos para a malária cerebral e para as síndromes placentária e anêmica, os quais estão bem estabelecidos (CHANG; STEVENSON, 2004; DE SOUZA; RILEY, 2002; NERES et al., 2008; NIIKURA; INOUE; KOBAYASHI, 2011).

Com a finalidade de caracterizar um modelo para injúria pulmonar, Lovegrove e colaboradores, em 2008, utilizaram camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados com *P. berghei* ANKA. Eles observaram a presença de inflamação no septo, ruptura da membrana alvéolo-capilar, edema pulmonar proteináceo de origem não cardiogênica e sequestro de parasitas dependente da molécula CD36. No entanto, neste modelo, não foi identificada a transmigração celular para o espaço alveolar, bem como a infiltração de neutrófilos (LOVEGROVE et al., 2008).

Outro trabalho recentemente publicado também utiliza o modelo experimental com *P. berghei* ANKA e camundongos C57Bl/6 para estudar a SDRA-AM (SOUZA et al., 2013). Contudo, esta associação (C57Bl/6 e *P. berghei* ANKA) já é bem estabelecida para estudos sobre MC, levando a uma alta mortalidade dos camundongos entre 6 a 8 dias após a inoculação do parasita com manifestações características de MC (AMANTE et al., 2010; DE SOUZA; RILEY, 2002; HEARN et al., 2000; LOVEGROVE et al., 2006; YAÑEZ et al., 1996). Desta maneira, mesmo que os camundongos infectados apresentam alguns indícios de SDRA no início da infecção, eles vão a óbito por MC (SOUZA et al., 2013).

Van den Steen e colaboradores, em 2010, propuseram um modelo experimental com camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados com 10^4 eritrócitos parasitados (EP) de *P. berghei* NK65. Com este modelo, não foram observados sinais cerebrais e os camundongos apresentaram um aumento do peso dos

pulmões, edema pulmonar rico em proteínas e formação de membrana hialina (VAN DEN STEEN et al., 2010).

Outro modelo foi proposto, envolvendo a associação entre o parasita *P. berghei* K173 e camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados com 2 x 10^6 EP. Os animais infectados apresentaram, principalmente, congestão dos capilares com leucócitos e eritrócitos, bem como a presença de leucócitos no parênquima pulmonar, porém apresentaram um quadro de comprometimento leve (HEE et al., 2011).

Ainda em 2010, nosso grupo desenvolveu um modelo murino que apresenta quadro histopatológico semelhante à injúria respiratória aguda / síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) associado à malária humana, utilizando camundongos da linhagem DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA (PbA). Esta associação resultou em dispneia, obstrução das vias aérea, aumento da permeabilidade vascular, efusão pleural, hemorragias e edema pulmonar em 30 a 60 % dos camundongos e nenhum deles apresentaram qualquer indício ou sintoma de malária cerebral. Neste trabalho foi demonstrado que o VEGF é fundamental para o desenvolvimento da síndrome respiratória associada à malaria (EPIPHANIO et al., 2010).

Com esse modelo, propusemos um modelo preditivo onde conseguimos identificar os animais que desenvolverão a SDRA ou não, no 7º dia pós-infecção, além de demostrar outros achados similares com a SDRA humana, como opacidade pulmonar observada ao raio X, presença de membrana hialina e hipoxemia evidente (ORTOLAN et al., 2014).

Ainda demonstramos o papel essencial dos neutrófilos no desenvolvimento da SDRA associada à malária (SDRA-MA), uma vez que observamos que os animais DBA/2 infectados com PbA, que desenvolvem SDRA, possuem mais neutrófilos nos pulmões em relação aos animais que não desenvolvem e a depleção desses neutrófilos diminuiu o desenvolvimento da SDRA-MA e aumentou a sobrevivência dos animais. Também verificamos, pela primeira vez, um importante mecanismo da patogênese envolvendo estes neutrófilos, que é a formação de redes extracelulares (NETs) (SERCUNDES et al., 2016).

Nosso grupo ainda constatou que a indução da heme-oxigenase-1 em DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA com hemina reduziu níveis séricos de VEGF e de citocinas pró-inflamatórias, diminuiu a permeabilidade vascular, indicando a ação

protetora desta droga sobre os efeitos lesivos no endotélio microvascular dos pulmões, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (PEREIRA et al., 2016).

2.9 Citoadesão na malária

Em infecções ocasionadas por *Plasmodium falciparum* em humanos, o fenômeno da citoaderência está bem elucidado como um importante fator que leva à malária grave. (CRAIG; KHAIRUL; PATIL, 2012; DE LAS SALAS et al., 2013; SHERMAN; EDA; WINOGRAD, 2003).

As proteínas da família PfEMP1 (proteína da membrana do eritrócito *P. falciparum 1*) são responsáveis por mediar a adesão de eritrócitos infectados as células endoteliais (CE), através de ligação específica com múltiplos receptores, incluindo CD36, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), E-selectina, e CD31 (PECAM-1), e ao receptor placentário condroitina sulfato A (CSA). A ligação de PfEMP1 com o endotélio resulta em sequestro generalizado de eritrócitos parasitados (EP) e, consequentemente, a redução da destruição de EP, presentes na corrente sanguínea, pelo baço. EP aderidos também ativam as CE, levando a respostas pró-inflamatórias e pró-coagulantes, reduzem as funções da barreira endotelial e prejudicada do tônus vasomotor. Estudos *post-mortem* têm fornecido evidências correlacionando o sequestro do *P. falciparum* em órgãos específicos a algumas formas clínicas da doença. Embora não haja evidências claras, especula-se que estes parasitas promovam interações locais com as CE para a sua própria sobrevivência, como mecanismo de escape, e essas interações produzem as manifestações clínicas da malária (AVRIL et al., 2016).

P. falciparum possui aproximadamente 60 genes de alta virulência (genes *var*), cada um dos quais codifica uma variante diferente de PfEMP1. Cada parasita expressa um único gene var de cada vez, mantendo todos os outros genes *var* num estado silencioso. Quase todos os membros da família *var* são classificados em três grupos principais (A, B e C), com base na combinação de localização cromossômica, direção de transcrição e uma sequência promotora. A variação antigênica clonal modifica as propriedades antigênicas e de ligação do EP. Cada um dos receptores do hospedeiro para PfEMP1 tem um padrão de expressão única na vasculatura. Por exemplo, CD36 é expresso em células endoteliais microvasculares, mas não é

detectável em CEs a partir de certos vasos de grande calibre, incluindo artérias musculares e veia hepática. ICAM-1 e E-selectina são diferencialmente expressas no endotélio em condições basais e em resposta à inflamação. A capacidade das variantes de PfEMP1 para atingir diferentes receptores endoteliais, que em si são distribuídos de forma heterogênea, ajuda a explicar porque alguns pacientes com malária apresentam-se com síndromes específicas de determinados órgãos. Por exemplo, na malária associado com a gravidez, a variante de do gene *VAR2CSA* quando transcrito gera a proteína PfEMP1 que tem como ligante CSA localizada nos núcleos do estroma viloso da placenta, que ficam expostas ao sangue materno após desnudação do sinciciotrofoblasto (JESPERSEN et al., 2016).

ICAM-1 tem sido implicado como um importante receptor para ligação de *P. falciparum* no endotélio cerebral. Em autópsias, foram observados eritrócitos parasitados em co-localização com vasos positivos para ICAM-1 (TURNER et al., 1994) e vasos com maiores níveis de ICAM-1 tem maiores cargas de eritrócitos parasitados sequestrados (SILAMUT et al., 1999). ICAM-1 e o receptor da proteína C endotelial (EPCR) são receptores candidatos às complicações da malária grave. No entanto, não está claro se a ligação de EP por *Plasmodium falciparum* com ICAM-1 e a EPCR está envolvido com a citoadesão de diferentes subpopulações de parasitas na microvasculatura do cérebro. Em um estudo recente, foi observado que duas linhagens de parasitas expressando o domínio 13 de PfEMP1 tem ligação dupla a EPCR e ICAM-1 (AVRIL et al., 2016).

O EPCR tem a função principal de mediar a função citoprotéica da proteína C ativada (APC), o EPCR se liga à APC e cliva o receptor 1 ativado por protease (PAR-1) que divide especificamente a via RAC1, inibe a ativação da factor nuclear κβ e fornece proteção de barreira endotelial (SHABANI et al., 2016). O EPCR facilita a ativação da proteína C (PC) pelo complexo trombina-trombomodulina; já foram observados efeitos citoprotectores do EPCR na proteção vascular e tecidual no cérebro, pulmões, rins e fígado (SHABANI et al., 2016). As atividades citoprotetoras da APC fornecem efeitos neuroprotetores que incluem a proteção da barreira hematoencefálica, bem como atividades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas dentro da unidade neurovascular, efeitos nefroprotectores e efeitos antiinflamatórios no pulmão e, portanto, essas atividades de APC podem ser diretamente relevantes para as complicações associadas à malária grave (MOSNIER; LAVSTSEN, 2016).

De fato, estudos *in vitro* com domínios CIDRα1 purificados e estirpes laboratoriais de EP com *P. falciparum*, confirmam a perda da funcionalidade EPCR após a ligação CIDRα1 ou EP, que inclui a perda da ligação PC e APC ao EPCR, a inibição da ativação da PC mediada por EPCR e a obstrução dos efeitos protetores da barreira endotélial mediada por APC. Conseqüentemente, a ligação da PfEMP1 ao EPCR resulta em uma deficiência funcional do sistema de proteína C adquirida, o que suporta as novas evidências de que o EPCR desempenha um papel central na patogênese da malária grave (MOSNIER; LAVSTSEN, 2016).

A ligação de EPCR é mediada através da região de interdomínio rica em cisteína amino-terminal (CIDRa1) das subfamílias de DC8 e APfEMP1 do grupo e que CIDRa1 interfere com a ligação da proteína C ao EPCR (TURNER et al., 2013). Existem algumas evidências de que o PfEMP1 pode se ligar ao EPCR com efeitos importantes na malária grave, no entanto, não há evidências de associação de *Plasmodium berghei* ANKA ao EPCR e os efeitos do EPCR na patogênese SDRA permanecem por ser elucidados.

Esses receptores presentes nas células endoteliais dos mais diversos tecidos podem estar implicados na patogênese da síndrome respiratória aguda associada à malária grave.

2.10 Microvasculatura e o endotélio pulmonar

A vasculatura pulmonar é uma camada homogênea de células endoteliais escamosas que reveste toda a circulação pulmonar. Inicialmente, acreditava-se que era uma estrutura estática e inerte, entretanto o endotélio pulmonar é cada vez mais reconhecido como um órgão dinâmico, metabólicamente ativo, que modula várias funções reguladoras fundamentais, incluindo: diapedese dos leucócitos, coagulação intravascular, tonus vasomotor e a passagem de solutos e fluidos por meio da regulação de permeabilidade da barreira. (MILLAR et al., 2016).

O endotélio pulmonar é distinto da vasculatura sistêmica, na medida em que está exposto à maior tensão de oxigênio, enquanto mantém o fluxo sanguíneo de baixa pressão, interage com células através do sangue e com mediadores vasoativos para detectar estímulos mecânicos, químicos e celulares. Embora isso permita ao endotélio regular a inflamação local, a interrupção dos mecanismos

homoeostáticos endoteliais do pulmão o transforma de um fenótipo principalmente antiinflamatório para um fenótipo proinflamatório ativado que propaga a inflamação do parênquima pulmonar (MILLAR et al., 2016).

O endotélio pulmonar forma uma única camada de células endoteliais derivadas do mesênquima, funcionando como uma barreira semipermeável que separa a circulação pulmonar do intersticio pulmonar, regulando macromoléculas, nutrientes, leucócitos e transferência de fluidos (MILLAR et al., 2016).

A integridade desta barreira é determinada por interações homofílicas entre células endoteliais vizinhas através de junções intercelulares [(junções oclusivas e junções de aderência (JAs)]. Essas junções ligam as células endoteliais e são servidas por microtúbulos do citoesqueleto e microfilamentos de actina para facilitar a manutenção da função de barreira e a modulação da transdução de sinal em resposta às forças de tensão e contráctil exercidas sobre o endotélio durante a ventilação mecânica (MILLAR et al., 2016).

As junções oclusivas são formadas pela fusão das camadas externas das membranas plasmáticas e são constituídas por moléculas de adesão, claudinas e adesão acopladas a proteínas citoplasmáticas e ligadas ao citoesqueleto de actina de células endoteliais (MILLAR et al., 2016). São os principais componentes apicais do complexo de junções, medeiam a adesão e comunicação entre células adjacentes, são responsáveis por regular a permeabilidade parecelular e manter a polaridade celular, sendo as principais proteinas a ocludina e a família das claudinas (composta por mais de vinte membros) (BAZZONI, 2004).

As JAs são compostos de caderinas, principalmente caderina endotelial vascular (VE-caderina), que se ligam às proteínas intracelulares de catenina (incluindo a p120-catenina, uma proteína estabilizadora de VE-caderina) que, por sua vez, se ligam a outros parceiros protéicos no citoesqueleto de actina. As JAs são mediados pela associação dependente de cálcio das proteínas da caderina e regulam o transporte paracelular (a via predominante) das células e solutos entre o sangue e o interstício. Assim, os JAs e, especificamente, a VE-caderina, são reguladores-chave da permeabilidade intercelular, que determinam a transmigração de leucócitos e a formação de edema, enquanto as caveolinas regulam o tráfico transendotelial (transcitose) de macromoléculas, incluindo albumina (MILLAR et al., 2016).

Outro tipo de junções, as junções comunicantes, também fazem a mediação da comunicação célula-célula, esta estrutura é formada por conexinas (cx), sendo três dessas proteinas (cx 43, cx 40 e cx 37) expressas no endotélio, elas são organizadas em conexons, que são canais para a passagem de íons e moléculas de pequeno peso molecular (BAZZONI, 2004).

O endotélio desempenha papéis regulatórios adicionais na troca gasosa, tonus vascular e coagulação. Como componente integral da unidade alveolar-capilar, é estrutural e funcionalmente otimizado para facilitar a correspondência perfusão-ventilação. Assim, as células endoteliais do pulmão regulam a síntese e o metabolismo de compostos vasoativos como o óxido nítrico e endotelina-1, potentes reguladores do tonus vascular pulmonar. Além disso, o endotélio também produz substâncias tanto pró-trombóticas como antitrombóticas que atuam tanto local como remotamente para regular a coagulação. Ele separa os componentes do sangue (por exemplo, plaquetas) e componentes humorais (por exemplo, fatores de coagulação da cascata de coagulação) de substâncias protrombóticas no intersticio pulmonar e espaço alveolar (MILLAR et al., 2016).

As células endoteliais (CE) são as células de revestimento dos vasos sanguíneos, cuja a função é criar uma interface ativa, seletiva e permeável entre os vasos sanguíneos e o tecido, que controla a passagem de nutrientes, gases e células do sistema imune. Essas células também exercem funções parácrinas e endócrinas. A morfogênese do sistema vascular embriogênico começa com os angioblastos, ou células endoteliais progenitoras. Angioblastos são células mesodérmicas do tipo fibroblastos capazes de migrar, reconhecer outros angioblastos, aderir e se organizar em estruturas vasculares (LOIOLA et al., 2013). Uma vez que um angioblasto é recrutado para formar um tubo vascular ou um vaso e se diferencia em células endoteliais. Os principais passos na especificação e diferenciação de CE são direcionados pela interação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) com o receptor vascular de fator de crescimento (VEGFR-2), que é expresso em CE. VEGF e os receptores VEGFR-1 (também conhecido como Fit-1) e VEGFR-2 (também chamado KDR ou Flk-1) tem sido descritos como reguladores críticos da diferenciação endotelial, bem como formação de vasos sanguíneos (VOELKEL; ROUNDS, 2009).

O principal receptor para VEGF é o receptor tirosina-quinase VEGFR-2, o qual é crucial para a angiogênese e vasculogênese e é um dos marcadores mais

confiáveis de angioblastos e células endoteliais diferenciadas (VOELKEL; ROUNDS, 2009). CE podem ser ativadas por vários estímulos, como trombina e histamina e, quando ativas sintetizam fator de ativação plaquetária (PAF) que age com a P-selectina na adesão de plaquetas e neutrófilos no endotélio (SUMPIO; TIMOTHY RILEY; DARDIK, 2002).

Células endoteliais HUVECS (sigla proveniente do inglês "*human umbilical vein endotelial cells"*) produzem TNF que pode estar envolvido na ativação autócrina dessas células (IMAIZUMI et al., 2000). CE ativadas também produzem IL-8, que estimula a quimiotaxia de neutrófilos e degranulação. IL-8 também regula a adesão de neutrófilos e promove transmigração. As CE também podem produzir outros mediadores inflamatórios, tais como IL-1, IL-6, LTB4, C4, D4, E4, MCP-1, MCP-2, MHCII, fatores de crescimento (PDGF, EDGF, FGF, IGF, TGF-β, GM-CSF, G-CSF), fatores pró-coagulantes (vWF, TXA2, tromboplastina, fator V, PAF, PAI-I,PAI-2) (SUMPIO; TIMOTHY RILEY; DARDIK, 2002).

Células endoteliais primárias geralmente apresentam produção constitutiva elevada de fator de *von Willebrand* (vWF), da molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1 ou CD31) e de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (UNGER et al., 2002). Sabe-se também que a VE-caderina é uma molécula de adesão estritamente específica de células endoteliais, localizada nas junções intercelulares, de grande importância para a manutenção e controle do contato celular (VESTWEBER, 2008). No entanto, as CEs respondem a estímulos pró-inflamatórios, por indução de outras moléculas de adesão, tais como molécula de adesão celular intercelular 1 (ICAM-1 ou CD54), molécula de adesão celular endotelial vascular (VCAM-1 ou CD106) e E-selectina (CD62E) (UNGER et al., 2002). As CEs também são reconhecidas por expressar óxido nítrico sintase (e-NOS), molécula essencial para mediação da angiogênese, induzida por VEGF, para a produção de óxido nítrico (KROLL; WALTENBERGER, 1998). E, além disso, expressam enzima conversora de angiotensina (ACE), de importante função na sinalização endotelial e remodelamento vascular (KOHLSTEDT et al., 2004).

A enzima conversora da angiotensina (ACE) está distribuída uniformemente na superfície luminal de células endoteliais e sítio catalítico fica exposto na corrente sanguínea, é um marcador sensitivo da disfunção pulmonar endotelial, cuja principal função é a hidrólise de angiotensina I em angiotensina II e na quebra da bradicinina. A redução na concentração de ACE tem sido um dos primeiros sinais detectados em

diferentes modelos animais de SDRA (HERMANNS et al., 2013; LOIOLA et al., 2013). O estudo das células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2 permitem análises mais detalhadas da interação dos eritrócitos parasitados e a microvasculatura pulmonar, bem como as interações entre células endoteliais e os fatores inflamatórios e a sua função na ativação endotelial.

Assim, face às inúmeras lacunas existentes no que se refere à patogenia da SDRA associada à malária, o presente projeto teve como objetivo final analisar o efeito da adesão dos eritrócitos infectados às células endoteliais pulmonares. Este estudo foi realizado em um modelo murino de infecção e, visou contribuir para a compreensão da SDRA-AM.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Partindo do pressuposto que citoadesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais pulmonares pode ser um componente importante na patogênese da SDRA e responsável pelo desencadeamento do intenso processo inflamatório local, o objetivo deste trabalho foi avaliar esta citoadesão, bem como o envolvimento de moléculas de adesão e, seus efeitos, em modelo experimental.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a importância da citoadesão de eritrócitos parasitados em células endotelias no desenvolvimento da SDRA associada à malária;
- ✓ Estudar os efeitos de fatores inflamatórios nesta citoadesão;
- ✓ Avaliar o papel das moléculas de adesão no modelo murino de SDRA e em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2;
- ✓ Analisar a contribuição da resposta inflamatória e a produção de fatores inflamatórios em células endoteliais;
- ✓ Estudar os efeitos da inflamação, através da administração de dexametasona em modelo murino de SDRA e em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e parasitas

Tanto para os experimentos *in vitro* quanto *in vivo* foram utilizados camundongos das linhagens DBA/2 machos com 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo biotério do departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram criados e mantidos em mini-isoladores, em estantes ventiladas, em condições controladas de umidade, iluminação e temperatura e com acesso livre a alimento e a água.

A infecção dos animais, assim como o isolamento e sincronização de eritrócitos parasitados foi realizada com o plasmódio murino da cepa *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Os animais infectados foram inoculados com 10^6 eritrócitos parasitados (EP) via intraperitoneal (ip). Para eutanásia dos animais, administrou-se uma dose letal da solução composta por cetamina (Syntec, Brasil), 150 mg/kg e xilazina (Syntec, Brasil), 15 mg/kg via intraperitoneal (ip).

4.2 Comitê de Ética

Os procedimentos experimentais deste projeto estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram previamente aprovados pela comissão de ética no uso de animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, registrado sob nº 24 folha 16 do livro 03.

4.3 Parasitemia

A contagem da parasitemia foi realizada através de esfregaços sanguíneos, com uma gota de sangue coletada das caudas dos animais. Os esfregaços foram fixados com metanol e corados com solução de Giemsa, conforme descrito por Kitamura e colaboradores (KITAMURA et al., 1979) ou com o corante hematológico,

Panótico (Laborclin, Brasil, ref. 620529). A contagem da parasitemia, por meio de microscópio de luz (Carl Zeiss, Primo Star, Alemanha), foi realizada observando-se a proporção entre eritrócitos parasitados (EP) em relação aos eritrócitos não parasitados (EnP) expressa em percentagem. Dessa maneira, foram contados cem eritócitos em três campos diferentes, depois foi feita a média dos mesmos.

4.4 Análise da função respiratória

Camundongos infectados, bem como não infectados, foram dispostos em câmaras plestimográficas (BUXCO Eletronics, EUA) (Figura 6) para avaliação do padrão respiratório. O aparelho possui quatro câmaras que permite mensurar individualmente e simultaneamente o padrão respiratório de quatro animais. Os animais permanecem no interior das câmaras, (não anestesiados) durante 10 minutos e o aparelho mensura diversos parâmetros, dentre os quais a frequência respiratória (FR), volume tidal (VT) e o aumento da pausa respiratória (Penh, do inglês *enhanced pause*).

Figura 6 - Câmaras plestimográficas.
Câmaras plestimográficas utilizadas para mensurar o padrão respiratório de camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Fonte: (BUXCO Eletronics, EUA).

A frequência respiratória corresponde ao número de respirações por minuto. Já o aumento da pausa respiratória (Penh) é calculado pela fórmula: Penh = (PEF/PIF) x (Pausa), onde PIF: altura do pico inspiratório; PEF: altura do pico expiratório; Te:

tempo expiratório; Rt: tempo para expirar 65 % do volume; pausa: Te/Rt-1 (LOMASK, 2006) (Figura 7).

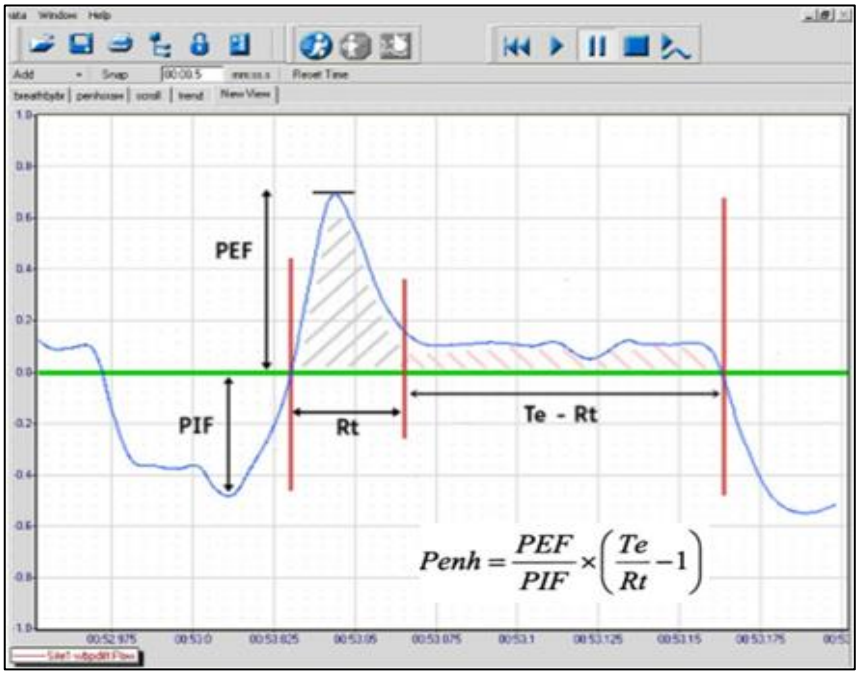

Figura 7 - Fluxo respiratório e aumento da pausa respiratória.
Fórmula do aumento da pausa respiratória (Penh) onde PIF: altura do pico inspiratório; PEF: altura do pico expiratório; Te: tempo expiratório; Rt: tempo para expirar 65 % do volume; Pausa: Te/Rt-1; Penh: PEF/PIFx Pausa. Fonte: adaptado de Lomask, 2006.

4.5 Classificação dos animais em síndrome do desconforto respiratório agudo ou hiperparasitemia

O modelo experimental de SDRA murino associada à malária, (camundongos DBA/2 infectados pelo *P. berghei ANKA*), onde cerca de 50 % desenvolve esta síndrome, reflete muitas características da síndrome respiratória aguda em humanos, tais como: presença de infiltrado inflamatório, edema, membrana hialina nos pulmões, hipóxia e opacidade torácica observada por exames radiográficos (ORTOLAN et al., 2014).

Para estudar diferenças entre animais que desenvolvem a síndrome SDRA e daqueles que vão a óbito por hiperparasitemia (HP) e anemia, nós utilizamos o modelo, desenvolvido em nosso laboratório, para predizer quais animais que desenvolveriam SDRA ou HP no 7º dia pós-infecção, valendo-se de parâmetros como a parasitemia, a frequência respiratória e o Penh, conforme demonstrado na

Figura 8 e previamente descrito por Ortolan e colaboradores (ORTOLAN et al., 2014).

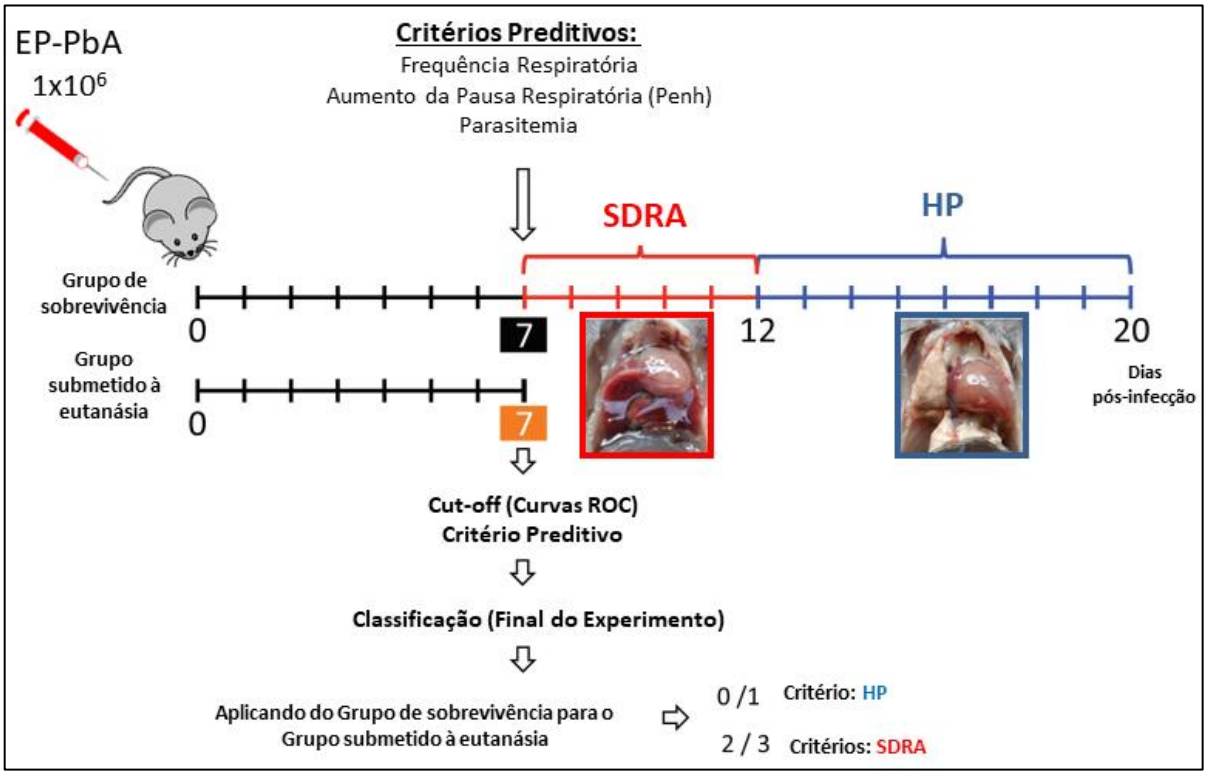

Figura 8 - Modelo preditivo para classificação dos animais em SDRA ou HP.
Camundongos DBA/2 são infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e divididos em dois grupos (grupo de sobrevivência e grupo eutanasiado). O grupo de sobrevivência, onde sabe-se com certeza a causa de morte do animal, os camundongos que apresentam síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) mostram efusão pleural e pulmões avermelhados e morrem entre 7 e 12 dia pós-infecção (dpi); os animais que vão à óbito por hiperparasitemia (HP) após esse período, não apresentam efusão pleural, mas sim hepatomegalia, esplenomegalia e pulmões acinzentados. No 7º dpi os critérios preditivos (parasitemia, aumento da pausa respiratória e frequência respiratória) são mensurados em ambos os grupos. O grupo de sobrevivência é mantido em observação por 20 dpi. Os valores dos critérios preditivos do grupo de sobrevivência definem os *cutt-off* para classificar os animais do grupo submetido à eutanásia. Os animais do grupo submetido à eutanásia que apresentam 2 ou 3 dos critérios, são classificados com SDRA. Fonte: adaptado de Ortolan et al, 2014.

4.6 Histologia

Para as análises histopatológicas, os pulmões dos camundongos eutanasiados no 7º dpi foram perfundidos e colocados em solução de formol tamponado 10 %, para os tecidos coletados no dia de óbito, não foi realizada a perfusão e foram diretamente dispostos em formol; após 24 horas o tecido foi transferido para álcool 70 %. Os pulmões foram emblocados em parafina e cortes de

5 µm de espessura foram realizados. Os tecidos utilizados nas análises histopatológicas foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

4.7 Captação da bioluminescência in vivo de eritrócitos parasitados em animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA Luciferase

Camundongos DBA/2 foram infectados com PbA expressando luciferase (PbA-L). No 7º dia pós-infecção, foi injetado 150 µl de luciferina (15 mg/ml) (VivoGlo™ *Luciferin*, In Vivo Grade, Catalogo #: P1041, Promega) via intraperitoneal, que permite a análise da presença do parasita, por emissão de bioluminescência pelo equipamento IVIS® Spectrum (PerkinElmer). Os animais foram inicialmente sedados com isofluorano para captação das imagens (cerca de 20 segundos após a injeção da luciferina). Posteriormente, foram submetidos a eutanásia com cetamina e Xilazina e perfundidos com 20 ml de PBS 1 x. Após a perfusão, foram capturadas novas imagens dos animais e, posteriormente, dos órgãos isolados dispostos em placas de petri estéreis.

4.8 Isolamento e cultura primária de células endoteliais pulmonares

As culturas de células endoteliais pulmonares primárias (CEPP) foram obtidas a partir de camundongos da linhagem DBA/2 (CEPP-DBA/2), conforme descrito em publicação prévia, com adaptações (CHEN; FEI; LI, 1995). Resumidamente, o animal foi submetido a eutanásia e todo o sangue foi removido através do corte das artérias carótidas. O pulmão foi coletado em condições estéreis, lavado em PBS 1 x e cortado em fragmentos de 1 mm de diâmetro e adicionados a placas de cultura de seis poços, com meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com baixa glicose (Gibco, *ThermoFisher scientific*, ref. 31600034), suplementado com 20 % de soro fetal bovino inativado (SFB) (Invitrogen, *ThermoFisher scientific*, ref. 12657029), 40 µg/ml de gentamicina (Invitrogen, *ThermoFisher scientific*, ref. 15710064), antibiótico-antimicótico na concentração de 1:100 (Gibco, *ThermoFisher scientific*, ref. 15240-096) e bicabornato de sódio (Invitrogen, *ThermoFisher scientific*, ref. 25080094)], pH 7,2.

Em 72 horas, ocorre a migração das células endoteliais que podem ser observadas através de um microscópio de luz Zeiss (Vert. A1). Neste momento, o tecido foi removido das placas para evitar a contaminação por fibroblastos. O meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias. Assim que as mesmas atingiam semi-confluência, foi realizada a passagem com 0,25 % tripsina EDTA (Gibco, *Thermo Fisher Scientific*, ref. 25200). As células foram utilizadas para experimentação entre a terceira e a quinta passagem.

4.9 Caracterização das células endoteliais primárias de pulmões de camundongos DBA/2

As CEPP-DBA/2 cultivadas foram caracterizadas por imunocitoquímica em lamínulas de 13 mm de diâmetro (cover slip - knittel glass), dispostas em placas de cultura de 24 poços de poliestireno. As lamínulas foram tratadas com gelatina 0,2 % diluída em PBS 1 x (gelatine from bovine skin – Sigma-Aldrich). As CEPP-DBA/2 foram dispostas em placas de cultura (4 x 10^4 células/poço) entre a 3ª e 5ª passagem. Para iniciar as marcações, o meio de cultura foi totalmente removido e as células foram lavadas três vezes com PBS 1 x. A seguir, foi adicionado formaldeído 3,7 % em PBS 1 x (10 minutos a temperatura ambiente). O formaldeído foi removido e as células foram novamente lavadas com PBS 1 x. Logo após, foi adicionado acetona PA por 5 minutos a -20 ºC para permeabilização, e posteriormente, a solução de bloqueio (PBS BSA 1 %) por uma hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as lamínulas foram removidas da placa e lavadas em PBS 1 x por imersão. Adicionou-se separadamente os anticorpos primários vWF (Santa Cruz – sc14014), eNOS (Abcam – ab87750), CD31 (Abcam – ab28364), ACE (Abcam – ab 85955), Ve-Caderina (Abcam – ab205336) e CD62-E (Abcam - ab18981) na concentração 1:200, exceto o vWF (Santa Cruz Biotechnology – sc14014) na concentração 1:10 e as células foram incubadas por 45 minutos a temperatura ambiente. O próximo passo foi lavar as lâminas com PBS 1 x e adicionar anticorpo secundário Alexa Flour 488 donkey anti-rabbit (Life Technologies – A21206) por uma hora a temperatura ambiente na concentração de 1:400.

Também foi realizada a imunomarcação com Ulex conjugado com Fitc (Sigma-Aldrich, EUA, ref. L9006) na concentração de 1:100. Posteriormente, foi

adicionado o marcador de ácido nucleico Hoechst 33342 (Life Technologies) 1:1000 por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro, utilizando-se o meio de montagem *Fluoromount Aqueous Mounting Medium* (Sigma-Aldrich, EUA) e observadas e fotografadas com uma câmera colorida Zeiss (Axio Cam HRc), conectada a um microscópio de luz Zeiss (Axio imager. M2).

4.10 Sincronização e enriquecimento dos eritrócitos parasitados

Com o objetivo de obter formas maduras do parasita (trofozoítos maduros e esquizontes), eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA (EP-PbA) foram coletados de animais DBA/2 infectados e foram sincronizados com adaptações do protocolo descrito previamente (JANSE; RAMESAR; WATERS, 2006).

Resumidamente, EP-PbA foram obtidos do sangue de camundongos da linhagem DBA/2 infectados EP-PbA no 6º dpi. O sangue coletado foi adicionado a uma garrafa de cultura de 75 cm^2 contendo meio DMEM a 25 % de soro fetal bovino. Em seguida, foi adicionada a mistura gasosa contendo 85 % de N_2; 10 % de O_2 e 5 % de CO_2 (White Martins), a garrafa foi vedada e o sangue em suspensão foi incubado a 37 ºC por 14 horas.

Após o período de incubação, foram isolados esquizontes, com a coluna de separação magnética MACS® Separation Columns (25 CS columns), (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) apoiada em um suporte de imã, que retém os eritrócitos parasitados (Figura 9), resultando em populações celulares com cerca de 95 % de eritrócitos parasitados com esquizontes. A coluna utiliza as propriedades magnéticas da hemozoína para separar os eritrócitos parasitados (os quais ficam retidos na coluna) dos eritrócitos não parasitados que passam pela coluna e são descartados.

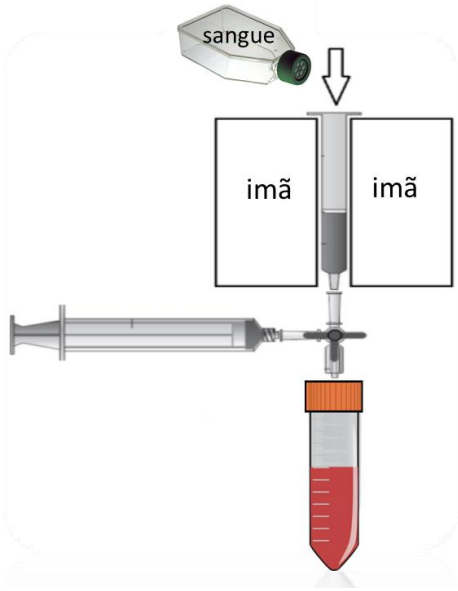

Figura 9 - Isolamento de formas maduras de eritrócitos parasitados.
Procedimento para isolamento das formas maduras de eritrócitos parasitados por *Plasmodium berghei* ANKA. Eritrócitos não parasitados passam pela malha de ferro enquanto as formas maduras de eritrócitos parasitados (trofozoítos maduros e esquizontes) são atraídas pelos imãs.

Em seguida, a fração de EP-PbA coletada pela coluna magnética foi lavada com meio de cultura DMEM (Gibco) e centrifugada a 270 g por 8 minutos, a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e os EP-PbA foram ressuspendidos em 3 ml de meio de cultura. Os eritrócitos não parasitados (EnP) foram obtidos do sangue de camundongos não infectados, também por punção cardíaca ou por coleta da veia submandibular. Da mesma forma, o sangue coletado foi lavado com meio de cultura e centrifugado. Após descarte do sobrenadante, os EnP foram ressuspendidos em 5 ml de DMEM (Gibco, *ThermoFisher scientific*) .

Para a realização dos ensaios experimentais, EP-PbA e EnP foram quantificados em câmara de Neubauer e depositados sobre as CEPP-DBA/2, na proporção de 25 EP-PbA ou EnP/célula.

Para a obtenção do extrato (Ext) do PbA, os esquizontes sincronizados e purificados, como previamente descrito, foram submetidos a choque térmico, por congelamento em nitrogênio líquido seguido de descongelamento em estufa a 56 ºC, por três vezes consecutivas. O extrato obtido foi armazenado a -80 ºC, em alíquotas correspondente a de 1 x 10^7 EP-PbA/ ml.

4.11 Ensaios com células endoteliais

Nos diferentes ensaios envolvendo CEPP-DBA/2 (adesão, citometria de fluxo, ELISA para VEGF, TNF, IL-6, IL-33, IL-10, CBA e PCR em tempo real) células foram dispostas em placas de cultura e estimuladas em diferentes tempos (1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas) com diferentes estímulos: IFN-γ recombinante 50 ng/ml (BD Bioscience, ref 554587), TNF recombinante 50 ng/ml (BD Bioscience, 554589), VEGF recombinante 100 ng/ml (Gibco, *Life Technologies*, Cód PMG0114), Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* 50 mg/ml (Sigma) e também com eritrócitos parasitados sincronizados de *Plasmodium berghei* ANKA (EP-PbA), eritrócitos não parasitados coletados de camundongos DBA/2 não infectados (EnP) e extrato do *P. berghei* ANKA (Ext) na proporção de 25/CEPP (Figura 10).

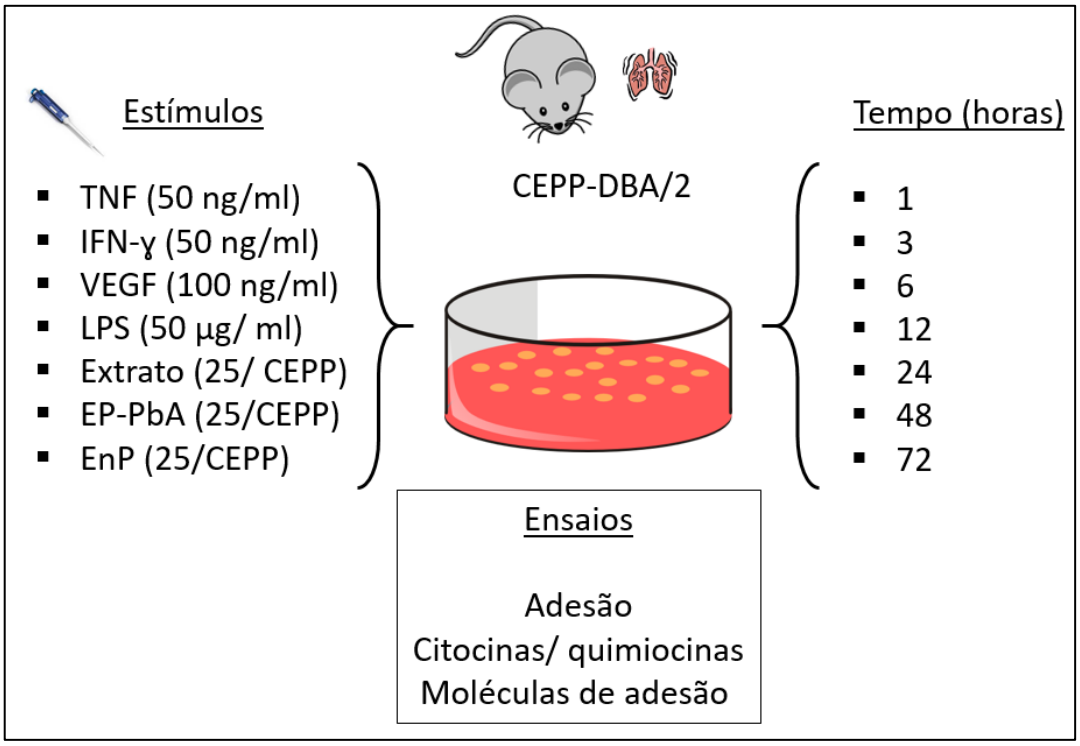

Figura 10 - Ensaios com células endoteliais.
Foram utilizados diferentes estímulos contendo fatores pró-inflamatório ou estímulos do *Plasmodium berghei* ANKA para verificar a capacidade de adesão, expressão gênica de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias.

4.12 Ensaio de atividade mitocondrial e viabilidade celular por MTT

A atividade mitocondrial e a viabilidade das culturas primárias de células endoteliais pulmonares foi analisada através do método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma, St. Louis). Este ensaio colorimétrico de viabilidade celular de MTT, foi projetado para quantificar o crescimento, a viabilidade e a proliferação celular, baseado na atividade da redutase mitocondrial (RISS et al., 2004). A viabilidade mitocondrial, e consequentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (sal de coloração amarela, solúvel em água) para cristais de formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água). Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2004). Considerando que, quando as células morrem, ocorre a perda da capacidade de converter MTT em cristais de formazan e, portanto, de gerar cor púrpura, este processo serve como marcador específico apenas para células viáveis, uma vez que este ocorre apenas em mitocôndrias ativas (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2004). Resumidamente, para a realização do ensaio de MTT, as CEPP-DBA/2 foram depositadas em placas de culturas de poliestireno de 96 poços (1 x 10^4 células/ poço). Após período necessário para adesão e confluência total, as células foram estimuladas em diferentes tempos (1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas) com IFN-γ (50 ng/ml), TNF (50 ng/ml), VEGF (100 ng/ml), LPS (50 mg/ml) e também com eritrócitos parasitados sincronizados (EP-PbA) e extrato de *P. berghei* ANKA (Ext) (técnica descrita no item 4.10) e com eritrócitos provenientes de camundongos DBA/2 não parasitados (EnP). O MTT foi preparado diluindo 0,5 mg/ml em meio DMEM sem soro, na diluição de 1:10. Nos tempos estabelecidos, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, foi adicionado o MTT (0,5ug/ml) por 3 horas a 37 ºC. Após esse período, o meio de cultura foi removido e adicionado 200 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido- Synth) (GERLIER; THOMASSET, 1986; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987). A leitura foi efetuada por espectrofotometria (comprimento de onda de 570 nm), em leitor de microplacas (Synergy HT, Biotek®, EUA), programa Gen 5. Para a análise, os valores de densidade óptica (DO) obtidos em células estimuladas foram comparados aos valores obtidos das células não estimuladas (NE) nos diferentes tempos observados.

4.13 Ensaios por citometria de fluxo

Células endoteliais foram soltas com tripsina 0,25% EDTA e adicionadas em placas de cultura de 12 poços (1 x 10^5 CEPP/ poço) por 24 horas até a aderência. As células foram estimuladas (TNF, IFN-γ, VEGF, extrato, EP-PbA, EnP por 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas) e após esse período o sobrenadante foi retirado, adicionado *staning buffer* e as células foram soltas com *cell scraper*, coletadas e centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4 ºC, o sobrenadante foi removido e adicionado o anticorpo primário por 30 minutos a 4 ºC [(ICAM- Biotina/ SA V500 AmCyan (hamster anti-mouse BD 553251), VCAM-V450/ Pacific Blue (rat anti-mouse BD 561615), CD36 - BB515/ Fitc (mouse anti-mouse BD 565094), Endoglina – PE (rat anti-mouse BD 562759), todos na concentração de 1:200]. Após esse período, as células foram lavadas com *staining buffer*, centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos e adicionado o anticorpo secundário (streptavidina para a marcação do ICAM-1 na concentração 1:400 por 30 minutos a 4 ºC). Foi adicionado o *staining buffer* às células, centrifugado para a remoção do anticorpo e as células foram ressuspendidas em *staining buffer* em tubos de citometria. A leitura foi realizada no Facs CANTO (Becton & Dickinson). Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo, versão 10,0.7.

Com o objetivo de analisar a viabilidade das CEPP-DBA/2 frente aos diferentes estímulos utilizados, em todos os experimentos de citometria de fluxo, as células coletadas foram marcadas com 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD da BD Pharmigen), um corante de ácido nucleico utilizado como um marcador de células não viáveis em ensaios de citometria de fluxo. Nesses ensaios foram adquiridos 30.000 eventos, foi realizado um *gate* para remover os “doublets” e um *gate* para selecionar a população de células endoteliais, em seguida foram verificadas as células mortas marcadas com 7-AAD.

4.14 Dosagem de VEGF

A quantificação do VEGF foi realizada em culturas de CEPP-DBA/2 estimuladas ou não por 24, 48 ou 72 horas com IFN-γ (50ng/ml), TNF (50ng/ml), LPS

(50 mg/ml) e também com eritrócitos parasitados sincronizados (EP-PbA), extrato do parasita (Ext) e eritrócitos não parasitados (EnP) (25/célula). Foi realizado um imunoensaio da técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) em 50 µl do sobrenadante utilizando-se kits comerciais (R&D Systems), de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura foi efetuada por espectrofotometria (comprimento de onda de 540 nm e 450 nm), em leitor de microplacas (Epoch, Biotek®, EUA). Os valores obtidos foram estimados através do coeficiente de determinação (R^2) obtido através da curva padrão.

4.15 Ensaio de adesão do *Plasmodium berghei* ANKA em células endoteliais em condições estáticas

A finalidade deste ensaio foi avaliar a capacidade de citoadesão do PbA em CEPP-DBA/2 tratadas ou não com os diferentes estímulos, tais como IFN-γ (50 ng/ml), TNF (50 ng/ml), VEGF (100 ng/ml), LPS (50 mg/ml), eritrócitos não parasitados (EnP) e extrato do parasita (Ext) 25/célula. As células (3×10^4 células/poço) foram dispostas em placas de cultura em lâminas Lab-tek *"Chamber slide"*, permanox, de oito poços (Thermo Fisher Scientific, ref. 177455). Posteriormente, foram adicionados os estímulos e mantidos por 1, 3, 6, 12, 24, 48 ou 72 horas. Após o estímulo, EP-PbA sincronizados foram adicionados por 1 hora nas culturas, na proporção de 25 EP-PbA por CEPP-DBA/2 (25:1) a 37 ºC e 5 % de CO^2 (Figura 11). Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e a câmara foi destacada das lâminas. A lâmina foi submetida à lavagem por imersão (10 vezes) em meio DMEM pré-aquecido. Após as lavagens, as lâminas foram fixadas com metanol, coradas com Panótico (Laborclin) e então observadas em microscópio óptico em imersão (aumento de 1000 vezes). O padrão de contagem utilizado foi a observação da quantidade de parasitas aderidos em 100 CEPP-DBA/2 e expressas em percentagem.

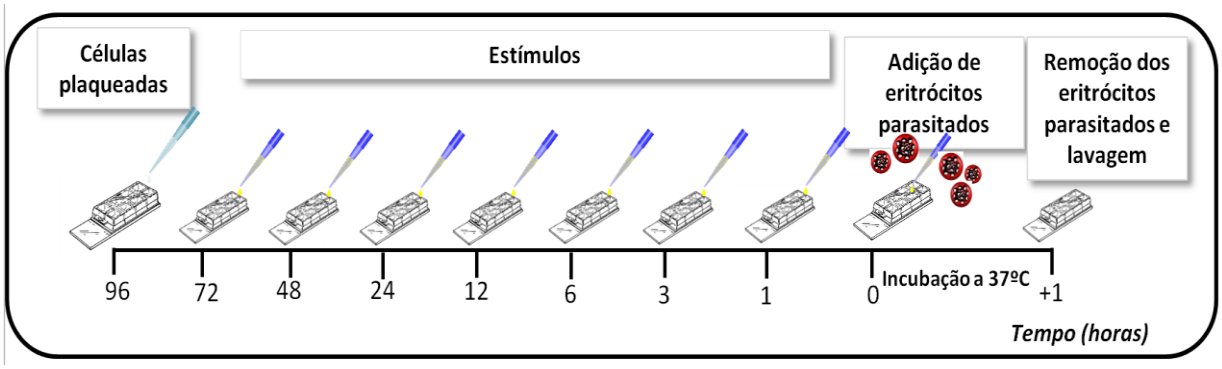

Figura 11 - Esquema representativo de ensaio de adesão estático.
Ensaios de adesão estático de eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA em células endoteliais realizados com estímulos diferentes e em tempos variados.

4.16 Ensaio de adesão do *Plasmodium berghei* ANKA em células endoteliais em fluxo

O objetivo do ensaio de adesão em fluxo é avaliar a capacidade dos eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA (EP-PbA) de aderir às células endoteliais da microvasculatura pulmonar do modelo animal DBA/2, simulando condições fisiológicas do fluxo sanguíneo, onde é necessária uma força de adesão.

Foram dispostas em placas de cultura CEPP-DBA/2 (8 x 10^4/poço) em chamber slides labteck, permanox de 2 poços (Thermo Scientific, *Nunc*, ref. 177429). As células permaneceram em estufa a 37 ºC e 5 % de CO_2 por 24 horas, até total aderência das mesmas. Após esse período foi adicionado TNF por 24 horas ou não (controle). Em sequência, o estímulo foi removido e adicionado formas maduras de EP-PbA (25 por célula) em DMEM suplementado com 20 % de SFB e deixou-se interagir com as células endoteliais durante 1 hora a 37 ºC na estufa de CO_2.

Posteriormente, os poços foram destacados das lâminas de poliestireno e as lâminas foram adicionadas ao sistema de fluxo, composto por: uma câmara (*Cell Adhesion Flow chamber, Immunetics*) (Figura 12) que manteve a lâmina aderida através da formação de um vácuo, realizado através do acoplamento de uma bomba de vácuo, uma bomba de seringa (insight Inc.), um microscópio invertido (Zeiss Vert. A1) conectado a uma câmara (Axio Cam ERc 5s Zeiss) e a um computador com sistema de captura de imagens (programa Zen 2011, AxioVision Rel 4.8.2 SP2).

A câmara foi inicialmente preenchida com meio DMEM e, em seguida, tirada uma foto inicial com os parasitas aderidos às CEPP-DBA/2, em seguida, foi

submetido um fluxo contínuo médio através da câmara mantido a 2 ml/ hora com uma bomba de seringa (insight Inc). Foram capturadas 5 imagens, de cada poço, mantendo o mesmo campo da imagem inicial, sendo 1 imagem a cada 3 minutos para se determinar a eficiência de ligação dos eritrócitos.

O processamento e a análise de imagens foi realizada pelo ImageJ (Versão 1.46r). As imagens foram abertas individualmente no ImageJ e analisadas através do plugin "*cell counter*", onde foram selecionados em cada imagem todos os EP-PbA. Após a contagem de todas as imagens foi feita a relação entre o total de EP-PbA identificados na imagem inicial, menos o total de EP-PbA que permaneceram na imagem final (15 minutos).

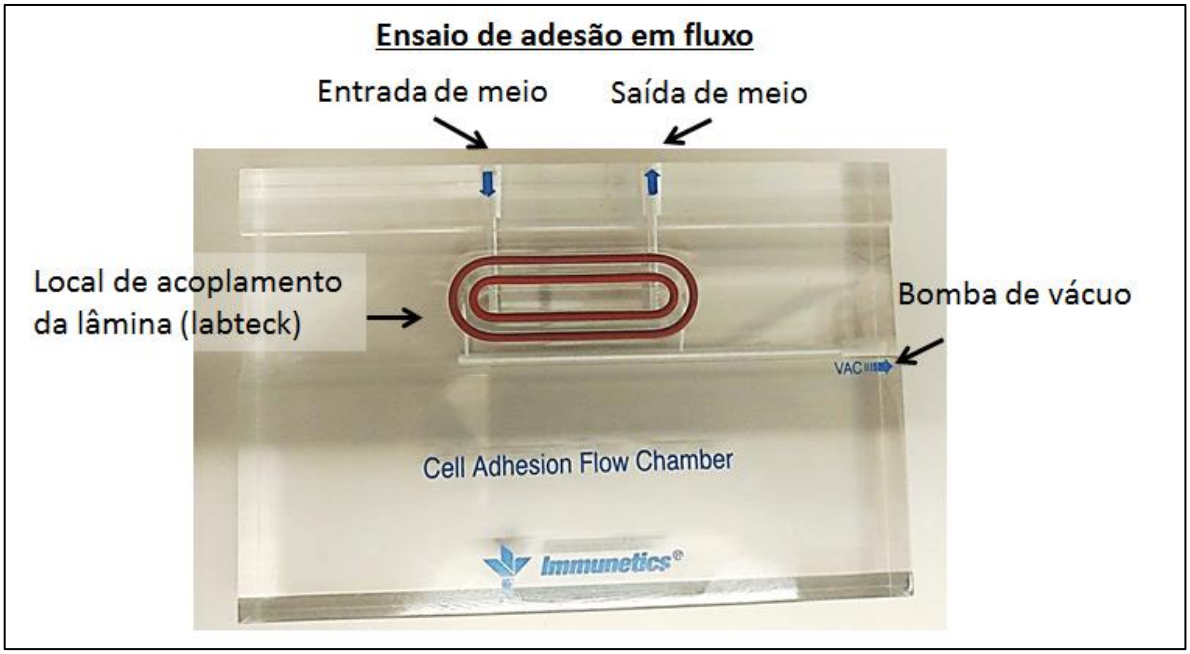

Figura 12 - Esquema representativo de ensaio de adesão em fluxo.
Imagem da câmara para ensaio de adesão em fluxo. A lâmina com a CEPP é colocada na câmara com a superfície das células em contato com as cânulas de entrada e saída de meio, a lâmina permanece aderida com o auxílio de uma bomba de vácuo acoplada na cânula da direita. As cânulas superiores são para entrada e saída do meio de cultura. As imagens são observadas em microscópio invertido com as objetivas de 40x.

4.17 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real

Foram realizados estudos para a quantificação relativa de genes a partir de cultura primária de CEPP-DBA/2, estimuladas ou não durante 1, 3, 6, 12, 24, 48 ou 72 horas com TNF (50 ng/ml), IFN-γ (50 ng/ml), LPS (50 µg/ml), VEGF (50 ng/ml), extrato do parasita, EP-PbA e EnP.

Também foi realizada a expressão gênica de citocinas e moléculas de adesão em pulmões de animais DBA/2 infectados com EP-PbA ou não infectados. A coleta e a extração das células foi efetuada com kit de extração de RNA “RNEasy Micro Kit” (Qiagen, Alemanha, ref. 74004), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Purification of total RNA from Animal and human cells).

Já a para a coleta e extração de tecido, os pulmões de camundongos DBA/2 infectados com PbA foram perfundidos, macerados em cadinho com nitrogênio líquido, adicionado 1 ml de TRIzol® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ref. 15596026) e as amostras foram mantidas a -80 ºC até a extração; a extração foi efetuada com o kit “RNeasy Mini” (Qiagen, Alemanha, ref. 74104), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

O RNA total foi quantificado no aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e a conversão em cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA da amostra, utilizando-se o kit *“Taqman Reverse Transcription Reagents”* para RT-PCR (Applied Biosystems, EUA, ref. N8080234), de acordo com as indicações do fabricante. A expressão gênica foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR), *PowerSYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA, ref. 4368577). Foi utilizado 1 µl de cDNA (0,02 µg/µl) e oligonucleotídeos (*primers*) dos genes de interesse. As moléculas analisadas estão descritos na tabela 1. Todos os resultados foram normalizados de acordo com a expressão do gene constitutivo HPRT (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase*) e os dados foram analisados através do método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme descrito por LIVAK, J.K e colaboradores, 2001 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A expressão gênica das células não estimuladas ou de animais não infectados foi utilizada como parâmetro basal. As reações de qRT-PCR foram realizadas no aparelho 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA).

Tabela 1 - Quadro com os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	*Nº gene bank*	*Tamanho do produto amplificado*	*Foward Primer 5'->3'*	*Reverse Primer 5'->3'*
ADAM17	NM_001291871.1	197	GTACGTCGATGCAGAGCAAA	AAACCAGAACAGACCCAACG
CD36	NM_001159558.1	187	TGGAGCTGTTATTGGTGCAG	TGGGTTTTGCACATCAAAGA
CD68	NM_009853.1	228	ACTCATAACCCTGCCACCAC	GATTTGAATTTGGGCTTGGA
EPCR	NM_011171.2	199	GACGAAGTTTCTGCCGCTAC	CTGGAGGATGGTGACGTTTT
HPRT	NM_013556	173	TGCTCGAGATGTGATGAAGG	TCCCCTGTTGACTGGTCATT
iCAM	NM_010493	211	CGAAGGTGGTTCTTCTGAGC	GTCTGCTGAGSCCCCTCTTG
Ncf2	NM_010877	243	GCAGTGGCCTACTTCCAGAG	CTTCATGTTGGTTGCCAATG
PbA	M19712	134	AGCATTAAATAAAGCGAATACATCCTTAC	GGAGATTGGTTTTGACGTTTATGTG
VCAM	NM_011693.3	195	AGTCCGTTCTGACCATGGAG	TGTCTGGAGCCAAACACTTG

4.18 Quantificação de IL-1β, IL-6, MCP-1, KC e RANTES por CBA

A quantificação de citocinas secretadas por CEPP-DBA/2 (IL1-β, IL-6, MCP-1, KC e RANTES) foi avaliada por CBA *"Cytometric Bead Array"* (BD Pharmingen), com os kits comerciais CBA Flex Set em sobrenadantes de cultura de CEPP-DBA/2, seguindo as recomendações do fabricante (BD Pharmingen). As amostras foram adquiridas utilizando o citometro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, USA). As análises foram realizadas com o software *"FCAP Array versão 3,0,1"* (BD Biosciences, USA). Os dados foram analisados e plotados em gráficos utilizando o software FlowJo, versão 10,0.7.

4.19 Imunoistoquímica

Para analisar a presença das proteínas de interesse por imunoistoquímica, foram utilizados anticorpos da Abcam ICAM-1 (ab124759), VCAM-1 (ab134047) e CD36 (Abcam, ab124515). Os pulmões de animais não infectados (NI) e de animais que vieram à óbito por SDRA ou HP, ou de animais SDRA classificados de acordo com o modelo preditivo no 7º dia pós-infecção (ORTOLAN et al., 2014), foram coletados logo após a morte, fixados em formol tamponado 10 % por 24 horas e

transferidos para álcool 70 %. Os tecidos foram emblocados em parafina e cortados em 5 µm de espessura. Para a marcação, primeiramente foi feita a hidratação e a recuperação antigênica com tampão citrato de sódio pH 6. A peroxidase endógena foi bloqueada com 3 % de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os cortes foram delimitados com caneta hidrofóbica (DAKO pen, Dako Denmark A/S, Dinamarca) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com *protein block* (SPD-015 Biogen) por 30 minutos em câmara úmida. Foi aplicado 50 µl de cada anticorpo primário (1:400). Os cortes foram mantidos a 4 ºC, por 16 a 18 horas. Foi adicionado 50 µl do primeiro reagente do sistema de visualização, o polímero, por 10 minutos, e então adicionado 50 µl do anticorpo secundário conjugado a HRP por 15 minutos (SPD-015 Biogen), ambos em temperatura ambiente. Finalmente, os cortes foram lavados e incubados com DAB [(3,3'-Diaminobenzidine) Spring - SPD-015 Biogen)] por 30 segundos. Os tecidos foram contra corados com hematoxilina, as lâminas foram desidratadas, montadas com Tissue-tek e lamínula. Os tecidos foram fotografados, utilizando-se uma câmara colorida Zeiss (Axio Cam HRc), conectada a um microscópio de luz Zeiss (Axio imager. M2). Para a análise, foram fotografados 12 campos por tecido de cada animal no aumento de 20 vezes. Posteriormente, as imagens foram analisadas através do software ImageJ [(versão 1.5 1K, *National Institute of Health*, USA) com a utilização do Plugin IHC Toolbox. Foram quantificadas as áreas de tecido de cada imagem através da ferramenta *"color treshould"* e, posteriormente, mensuradas as áreas específicas da marcação de DAB com a ferramenta *color treshould*. A área de marcação de DAB foi dividida pela área total de tecido de cada imagem (Figura 13).

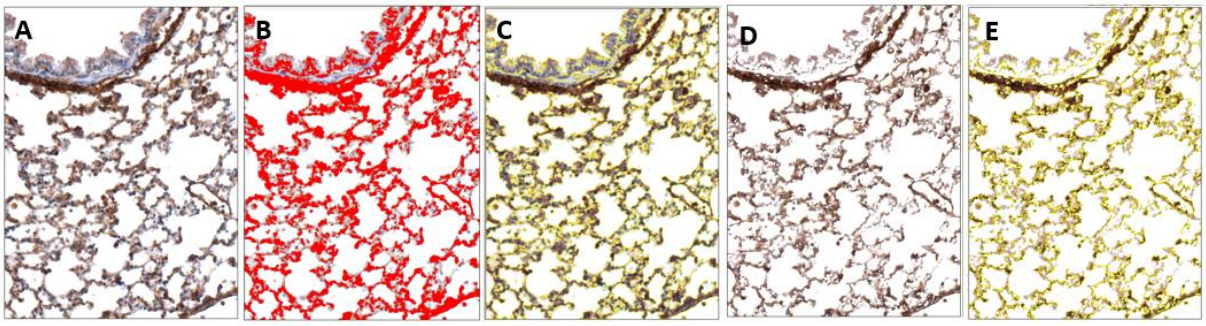

Figura 13 - Análise dos tecidos marcados por imunoistoquimica.
Imagem de um pulmão de camundongo marcado com ICAM-1 (A). Através do *treshould* de cores do ImageJ é marcada toda a área de tecido (B), a área de tecido é selecionada e mensurada (C) e através do plugin IHC toolbox é selecionada apenas a área marrom marcada com DAB (D) e então a área é selecionada e mensurada (E).

4.20 Obtenção de macrófagos peritoneais

Para verificar a ação macrófagos sobre a citoadesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais pulmonares, macrófagos peritoneais (MΦ) foram coletados. Estas células foram plaqueadas em membranas em poliéster (*transweell*), como descritos no item 4.22. Resumidamente, camundongos DBA/2, não infectados, foram eutanasiados com halotano, a seguir a pele foi removida e inserido 5 ml de PBS 1 x estéril (a 4 ºC) no peritônio. O líquido foi então removido, aspirado com agulha de 24 G, centrifugado a 1.000 rpm por 5 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio DMEM suplementado [20 % de SFB, gentamicina 40 µg/ml (invitrogen-15710064) e antibiótico/antimicótico 1:100 (Gibco-25200)]. As células foram contadas na câmara de neubauer e dispostas em placas de cultura em transwell pré-tratadas com gelatina.

4.21 Coleta de neutrófilos da medula óssea

Camundongos DBA/2 foram eutanasiados e os membros inferiores foram retirados, onde fêmur e tíbia foram separados para a extração de medula óssea conforme previamente descrito (SEMERAD et al., 2002). As células da medula foram lavadas em HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (Gibco, Life Technologies, EUA) ref. 14025-092 e em seguida centrifugadas a 900 g por 5 minutos a 4 ºC. O pellet foi ressuspendido em água destilada gelada para romper os eritrócitos e em seguida foi adicionado HBSS com 2 % SFB, para interromper a lise. Novamente as células foram centrifugadas a 900 g por 5 minutos a 4 ºC. As células então foram gentilmente colocadas em ficoll histopaque 1077, onde os neutrófilos formaram o pellet, enquanto as demais células ficaram acima do histopaque, formando um anel. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em HBSS com 2 % SFB para contagem.

4.22 Ensaio de transwell® com células endoteliais e macrófagos peritoneais ou com neutrófilos da medula óssea

Lamínulas de 13 mm de diâmetro (cover slip - knittel glass) estéreis foram dispostas em placas de cultura de 24 poços. As lamínulas foram tratadas com gelatina (*gelatine from bovine skin* – Sigma-Aldrich) 0,2 % diluída em PBS 1 x. Para isso, foram adicionados 300 µl da solução de gelatina nas lamínulas e, em seguida foi retirado todo o excesso da solução. Após a secagem da gelatina (40 minutos), as células endoteliais foram dispostas em placas de cultura (7 x 10^4 células/poço), em 400 µl de meio DMEM completo. Sobre o poço de 24 wells foram adicionadas as transwell com membrana em poliéster (diâmetro de membrana de 6,5 mm, poro da membrana de 0,4 um, Corning, Costar, ref. 3470) onde foram plaqueados 1 x 10^5 macrófagos peritoneais (MΦ) ou neutrófilos coletados da medula óssea (PMN).

Após 24 horas, 2,5 x 10^6 formas maduras de eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA (EP-PbA) ou eritrócitos não parasitados (EnP) foram adicionados sobre os MΦ ou PMN por 24 horas (25 EP-PbA/ MΦ ou PMN). Após esse período, o sobrenadante entre os (MΦ) ou PMN e as células endoteliais foi coletado para a quantificação de citocinas por ELISA. Subsequentemente, as células endoteliais foram estimuladas com 1,75 x 10^6 eritrócitos parasitados para ensaio de adesão (Figura 14).

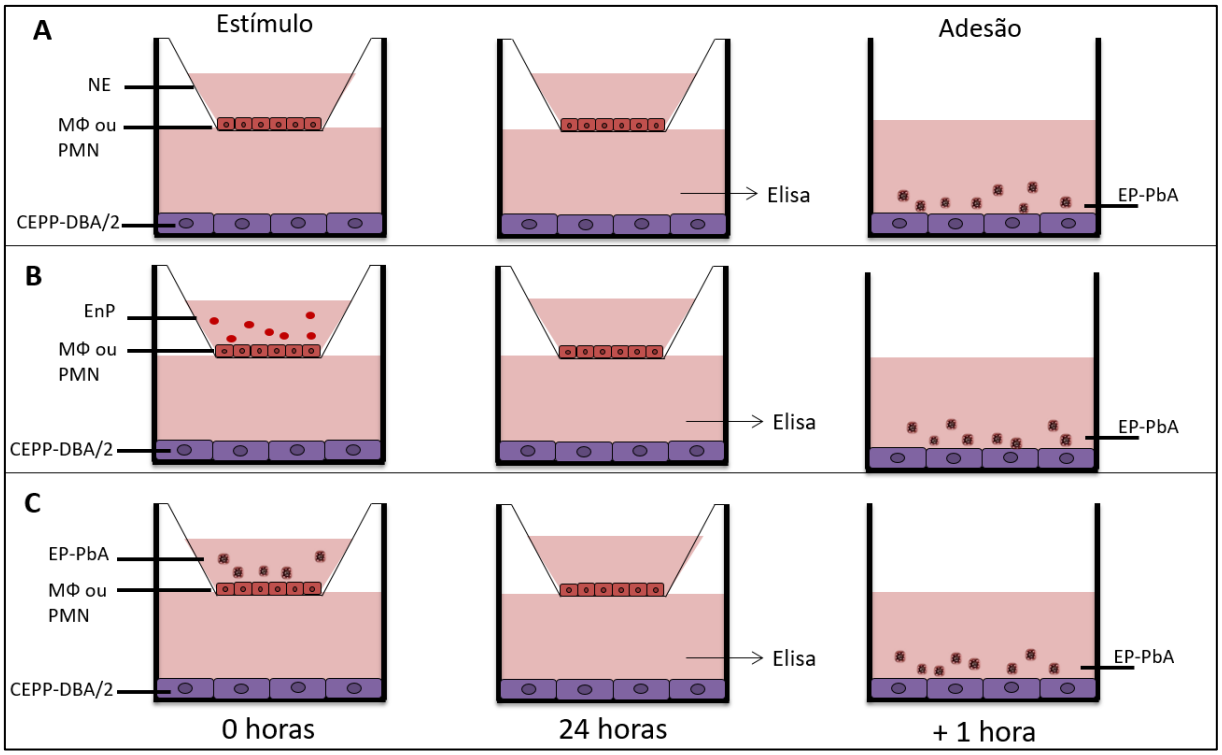

Figura 14 - Representação do ensaio de *transwell®* realizado em co-culturas de células endoteliais pulmonares e macrófagos peritoneais ou neutrófilos da medula óssea.
Esquema ilustrativo do ensaio de transwell realizado com CEPP-DBA/2 e neutrófilos da medula óssea ou macrófagos peritoneais não estimulados (A) estimulados com EnP (B) ou EP-PbA (C). Após 3 horas de estímulo, o sobrenadante da *transwell* foi removido e adicionado meio DMEM. Os neutrófilos ou macrófagos estimulados foram mantidos por 24 horas e após esse período, o sobrenadante das células endoteliais foi recolhido para mensurar citocinas por ELISA. As células endoteliais foram então estimuladas com EP-PbA por 1 hora, seguido de ensaio de adesão estático. (MΦ): Macrófagos peritoneais; PMN: neutrófilos da medula óssea; NE: não estimuladas; EP-PbA: Eritrócitos parasitados por *Plasmodium berghei* ANKA; EnP: Eritrócitos não parasitados; CEPP-DBA/2: células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.

4.23 Ensaio de Elisa para quantificação de TNF, IL-6, IL-10 e IL-33

Os ensaios de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para TNF, IL-6, IL-10 e IL-33 foram efetuados em soro de animais DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA ou em sobrenadante de células endoteliais, com os seguintes kits da affymetrix, eBioscience (San Diego, CA, EUA) *mouse Elisa Ready-Set-Go*: TNF (ref 88-7324-88), IL-6 (ref 88-7064-88), IL-10 (ref 88-7105-88), IL-33 (ref 88-7333-88), de acordo com as instruções dos fabricantes. Resumidamente foi realizado o *coat* com o anticorpo de captura (referente a cada um dos kits) em placa de Elisa de 96 poços (Corning) *overnight* a 4 ºC, a seguir a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem do kit, realizado bloqueio por uma hora a temperatura ambiente (TA) (com diluente ELISA/ELISPOST proveniente do kit). A

curva padrão e as amostras foram adicionadas à placa e incubadas a TA por 2 horas; após esse período as placas foram lavadas e adicionado o anticorpo de detecção por uma hora a TA, seguido de 3 lavagens e então adicionado 100 µl/ poço da avidina conjugada com peroxidade (HRP) por 30 minutos a TA. Finalmente as placas foram lavadas e incubadas com 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) 1 x por 15 minutos a TA e após esse período, adicionado o *Stop solution* para parar a reação (H_2SO_4 2 N). A leitura foi realizada por espectrofotometria (comprimento de onda de 450 nm e 570 nm), em leitor de microplacas (Synergy HT, Biotek®, EUA), programa Gen 5.

4.24 Tratamento com dexametasona

Camundongos DBA/2 machos, com 6 semanas de idade, foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com Dexametasona (Decadron, Ache) 80 mg/kg via intraperitoneal (ip) durante 3 dias (dias 4, 5 e 6 pós-infecção). Os animais foram observados diariamente por até 20 dias pós-infecção. Posteriormente, foi realizada a necropsia dos animais que vieram à óbito ou foram eutanasiados no 7 º ou no 20 º (*end point*) dia pós-infecção (Figura 15). Como controle, foram utilizados animais infectados, porém não tratados.

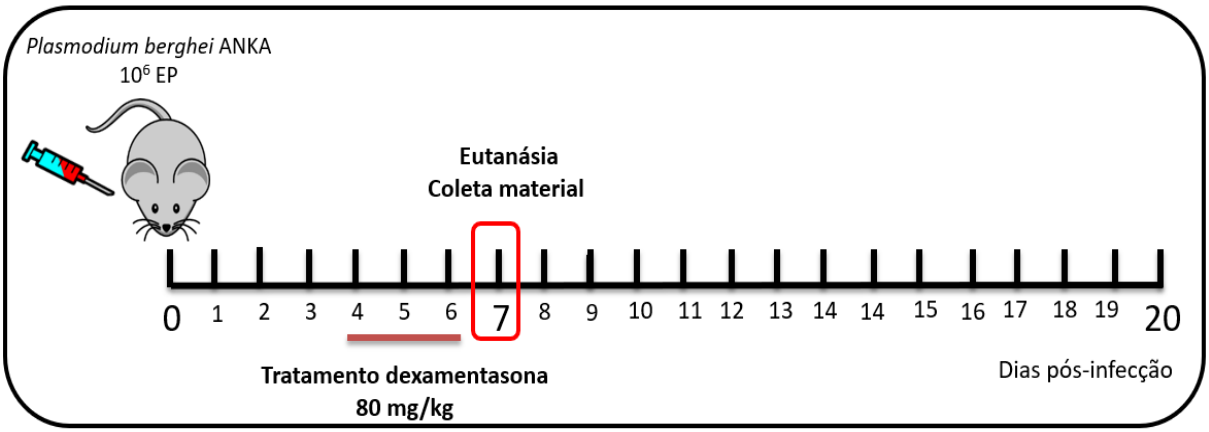

Figura 15 – Esquema representativo do tratamento com dexametasona.
Camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foram tratados com dexametasona no 4º, 5º e 6º dia pós-infecção via intraperitoneal. No 7º dia pós-infecção os animais foram eutanasiados e os pulmões e os soros coletados para análises.

4.25 Ensaio de permeabilidade vascular pulmonar

A permeabilidade vascular pulmonar foi avaliada através do corante Azul de Evans em camundongos não infectados e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (1 x 10^6 EP-PbA), tratados ou não tratados com dexametasona (Aché, Guarulhos, São Paulo, Brasil) conforme item 4.24. Para esta finalidade, no 7º dia pós-infecção, foram inoculados 200 µl do corante Azul de Evans na concentração de 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) via intravenosa (iv); 45 minutos após a administração do mesmo, os camundongos foram eutanasiados com a solução de cetamina/xilazina, perfundidos com 10 ml de PBS 1 x e os pulmões foram coletados, pesados e incubados em 2 ml de formamida (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a 37 ºC por 48 horas. Após este período, o órgão foi retirado da formamida e descartado. O sobrenadante, o qual continha o azul de Evans, foi mensurado por espectrofotometria valendo-se de filtros com comprimento de onda de 620 nm e 740 nm (Epoch, Biotek®, EUA). A formamida foi utilizada como branco para o teste. O valor de absorbância obtido na leitura de 620 nm foi subtraído da leitura de 740 nm, e então, o valor da absorbância obtido foi dividido pelo peso dos pulmões (em gramas). Os valores encontrados foram estimados através do coeficiente de determinação (R^2) obtido através da curva padrão.

4.26 Ensaio de permeabilidade por sistema de *Transwell*®

O aumento da permeabilidade foi analisado a partir de CEPP-DBA/2 incubadas em insertos de membranas permeáveis (4 x 10^4 células /inserto), com poros de 0,4 µM (*Transwell*® Corning, ref. 3470), pré-tratados com gelatina, acoplados em placas de poliestireno de 24 poços, mantidas em meio de cultura DMEM com 20 % SFB, mantidas a 37º C e 5 % de CO_2 (Figura 16). Após 96 horas, período necessário para adesão e confluência total, como determina alguns estudos (WOODRUFF et al., 2016), as células foram estimuladas com EP-PbA ou EnP, por 1 hora, na proporção de 25 EP-PbA/célula ou 25 EnP/célula. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por HBSS (sigla proveniente do inglês: *Hanks' Balanced Salt Solution*) e, no compartimento superior de cada inserto (em contato com as

células) foram incubados 200 µl de Azul de Evans (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), na concentração de 2 mg/ml, a 37º C. Após 30 minutos, os sobrenadantes do compartimento inferior, de cada amostra, foram coletados em triplicatas e analisados em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 650 nm (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific*). Finalmente, a partir da leitura de uma curva padrão de concentrações previamente conhecidas de Azul de Evans, de 0,2 mg/ml a 0,0031 mg/ml, no mesmo comprimento de onda, calculou-se a concentração de Azul de Evans de cada amostra.

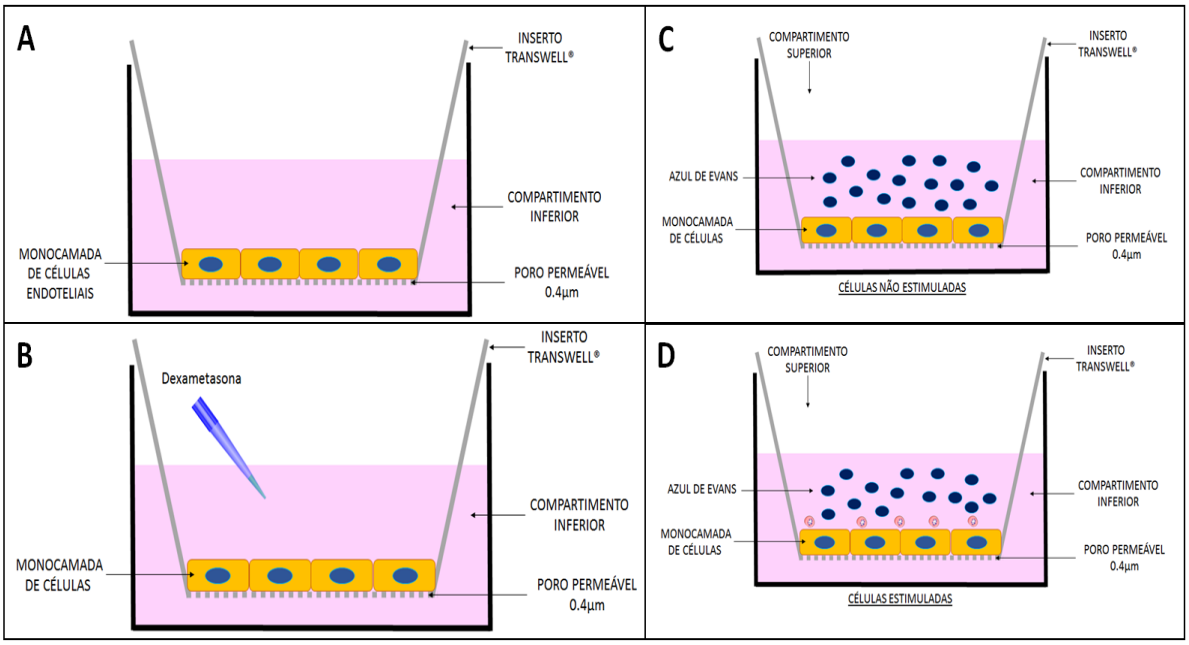

Figura 16 - Ensaio de permeabilidade vascular por sistema de *Transwell*®.
CEPP-DBA/2 foram cultivadas sobre membrana permeável do inserto, pré-tratadas com dexametasona e estimuladas com EP-PbA ou ENP. A quantificação da concentração de Azul de Evans do compartimento inferior, que atravessou a monocamada de células e os poros da membrana, foi realizada por espectrofotômetro, a 650 nm (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; ENP: eritrócitos não parasitados).

4.27 Identificação dos microfilamentos de actina por imunofluorescência e análise morfométrica das aberturas das junções interendoteliais

Para análise do rearranjo dos microfilamentos de actina através de marcação por imunofluorescência, as CEPP-DBA/2 foram incubadas e preparadas como descrito no item 4.9. Após período necessário para adesão e confluência total, um grupo de células foram estimuladas com Dexametasona por 24 horas,

posteriormente estimulada com formas maduras de EP-PbA ou EnP. Controles negativos foram realizados com as células não estimuladas (NE). Após a etapa de estímulos, as CEPP-DBA/2 passaram por lavagem, fixação e permeabilização, conforme também como descritas no item 4.9 nas marcações por imunofluorescência. Assim, os microfilamentos de actina foram identificados após incubação com Texas Red *Phalloidina* (Life Technologies, EUA, ref. T7471), por 20 minutos. Os núcleos celulares foram marcados, com Hoechst (H-33342, Life Technologies, EUA), na diluição 1:1000. Todas as soluções e anticorpos foram diluídos em PBS 1 %. As lamínulas foram colocadas sobre lâminas de microscopia de vidro, contendo o meio de montagem Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma, ref. M1289). As imagens foram capturadas pelo microscópio de fluorescência AXIO Imager M2 (Zeiss) e com a câmera AxioCam HRc.

Os diferentes tipos de estímulo foram avaliados em triplicatas. No mínimo, foram obtidas cinco imagens diferentes de cada lamínula, apenas de áreas totalmente confluentes. Para evitar a repetição de campos, cada lamínula foi inteiramente percorrida, em forma de *"zigue-zague"*, de cima para baixo. A área dos espaços intercelulares foi quantificada para verificar possíveis diferenças entre células estimulados com EP-PbA, com o sem o tratamento com dexametasona. Para isso, foi utilizada a ferramenta "measure" do Software ImageJ [(versão 1.5 1K, National Institute of Health, USA)] e a ferramenta *"wand (tracing)"* para determinar os espaços interendoteliais. Cada imagem foi analisada individualmente e as aberturas das junções interendoteliais (*"J-int"*) foram circuladas através do "*wand tracing*", onde a área de cada *"J-int"* foi calculada. Assim, a análise da diferença entre aberturas das junções interendoteliais dos diferentes estímulos foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5®.

4.28 Ensaio para neutralização de TNF

Lamínulas de 13 mm de diâmetro (cover slip - knittel glass) estéreis foram dispostas em placas de cultura de 24 poços. As lamínulas foram tratadas com gelatina (*gelatine from bovine skin* – Sigma-Aldrich) 0,2 % diluída em PBS 1x. Para isso, foram adicionados 300 µl da solução de gelatina nas lamínulas e, em seguida foi retirado todo o excesso da solução. Após a secagem da gelatina (40 minutos), as

células endoteliais foram dispostas em placas de cultura (7 x 10^4 células/poço), em 400 µl de meio DMEM completo. Após aproximadamente 24 horas, em alguns poços foi adicionados o anticorpo anti-mouse TNF-α Neutralizing (D2H4) Rabbit mAb #11969 (Cell signaling®, EUA) na concentração de 50 ng/ml por 24 horas; para controle do ensaio, algumas células foram estimuladas com TNF (50 ng/ml), ou com anticorpo IgG (Imuny, Brasil, ref. Im-0378), ou com o anticorpo TNF-Neutralizing + TNF.

Após o tempo de estímulo, o sobrenadante foi removido e foi adicionado esquizontes purificados e sincronizados de EP-PbA (1,75 x 10^6 EP-PbA/poço) por uma hora em estufa de CO_2 a 37 ºC. A seguir, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas 3 vezes com meio DMEM aquecido, após as lavagens, as lâminas foram fixadas com metanol, coradas com Panótico (Laborclin), montadas em lâminas com o meio de montagem Aquatex (Merck, Alemanha) e então observadas em microscópio óptico em imersão (aumento de 1000 vezes). O padrão de contagem utilizado foi a observação da quantidade de parasitas aderidos em 100 CEPP-DBA/2 e expressas em percentagem.

4.29 Análises estatísticas

Para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos onde não foi observada uma distribuição gaussiana, foram utilizados testes não paramétricos: teste Mann Whitney (para amostras ao comparar dois grupos) ou teste ANOVA Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunns (para comparar dados de mais de dois grupos). Para os demais dados, onde foi verificada uma distribuição gaussiana, foi utilizado o teste T (para comparar dois grupos) ou o teste de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni (para mais de dois grupos). As taxas de sobrevivência foram analisadas pelo teste Logrank. Os testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism versão 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para valores de $p \leq 0,05$. (*$p<0,05$, **$p<0,01$, $p<0,001$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo murino de síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária

5.1.1 A infecção de camundongos DBA/2 com Plasmodium berghei ANKA leva ao desenvolvimento de SDRA

Camundongos da linhagem DBA/2, machos, com 6 a 8 semanas de idade foram infectados com *P. berghei* ANKA (10^6 eritrócitos parasitados) e, observados até o 20º dia após a infecção. A infecção levou ao desenvolvimento de SDRA em animais que vieram a óbito entre o 7º e 12º dia após a infecção. Estes apresentaram alterações dos parâmetros respiratórios (Figura 17) e, presença de efusão pleural ou hidrotórax (em 100 % dos casos), hipoxemia, hemorragia pulmonar, edema pulmonar, conforme anteriormente publicado pelo nosso grupo (EPIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014). A medida do aumento da pausa respiratória (Penh), a frequência respiratória e a parasitemia são os principais parâmetros que diferenciam animais que desenvolvem SDRA ou HP.

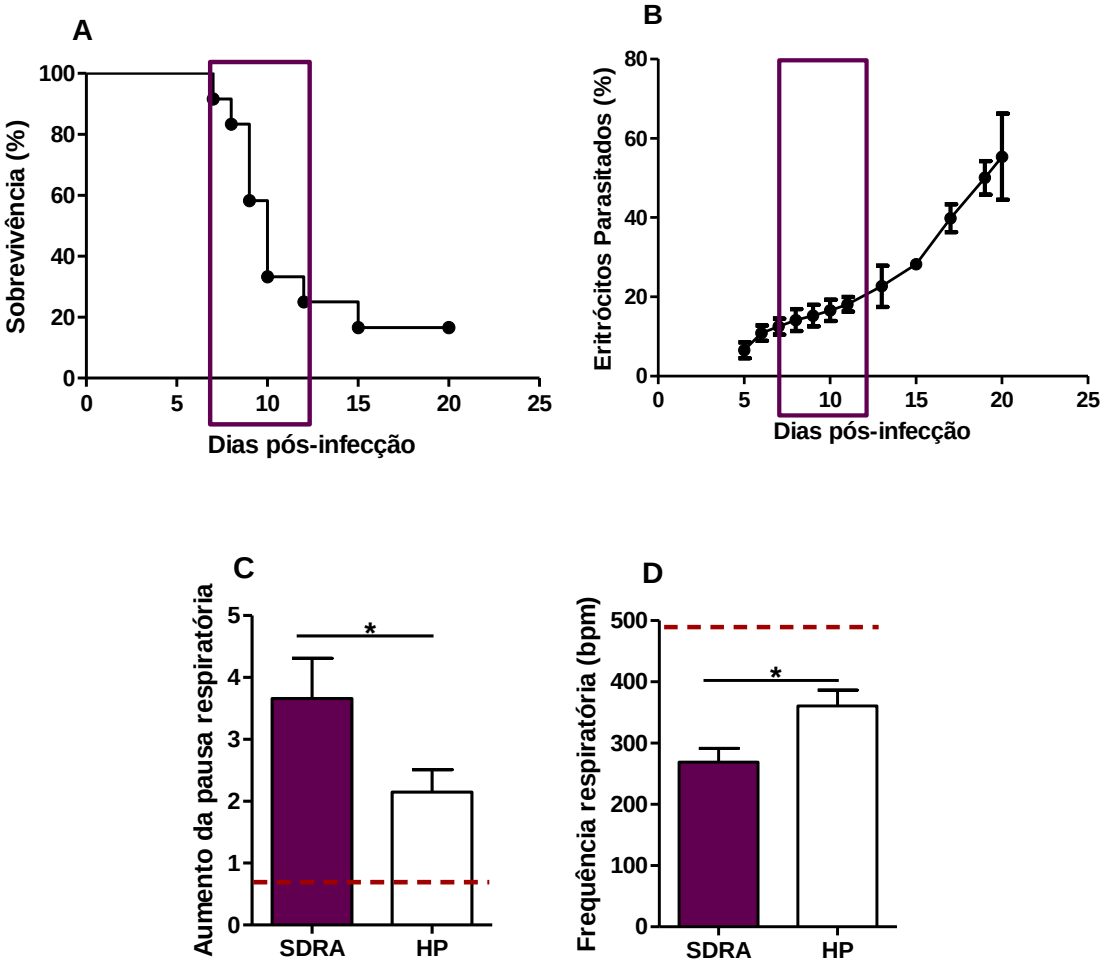

Figura 17 - Sobrevivência, parasitemia e padrões respiratórios do modelo experimental de SDRA associado à malária.
Camundongos DBA/2 foram infectados com 10^6 EP por *Plasmodium berghei* ANKA. Curva de sobrevivência (A) onde 75 % dos camundongos morreram de SDRA no período entre 7 e 12 dias após a infecção (dpi) com a presença de efusão pleural e curva de parasitemia (B). Os gráficos representam o aumento da pausa respiratória (C) e a frequência respiratória (D) mensuradas no 7º dpi. (n=12). Gráficos são representativos de 5 experimentos independentes. Média do perfil respiratório de camundongos DBA/2 não infectados estão representados pela linha tracejada. Dados representam média ± SEM (Teste mann Whitney onde * $p<0,05$, n=5 SDRA e n=8 HP). SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo; HP: hiperparasitemia. Bpm: batimentos por minuto.

5.1.2 Eritrócitos parasitados por Plasmodium berghei ANKA acumulam-se nos pulmões e baço de animais com SDRA

Em ensaios anteriores verificamos que no 7º dia pós-infecção há maior quantidade de parasitas nos pulmões de animais que desenvolveam SDRA em relação aos animais classificados como HP. Estes dados foram observados pela expressão gênica de *Plasmodium berghei* ANKA 18s por meio de PCR em tempo real e pela presença de hemozoína (observado por microscopia óptica com luz

polarizada) em pulmões de animais, previamente perfundidos (ORTOLAN, 2013). Além disso, verificou-se o contato de eritrócitos parasitados com as CEPP em cortes histológicos (dados ainda não publicados) e por microscopia eletrônica de transmissão (AITKEN et al., 2014).

Subsequentemente, verificamos a distribuição e a aderência dos eritrócitos parasitados nos diversos órgãos por bioluminescência. Animais DBA/2 foram infectados com a cepa de *PbA* expressando Luciferase (PbA-L). Após a injeção de luciferina, no 7º dia pós-infecção, observou-se eritrócitos parasitados amplamente distribuídos por toda a extensão corporal do animal (Figura 18 B). Porém, quando os camundongos foram perfundidos com PBS 1x, notamos que os parasitas concentravam-se principalmente nos pulmões e no baço (Figuras 18 C e D).

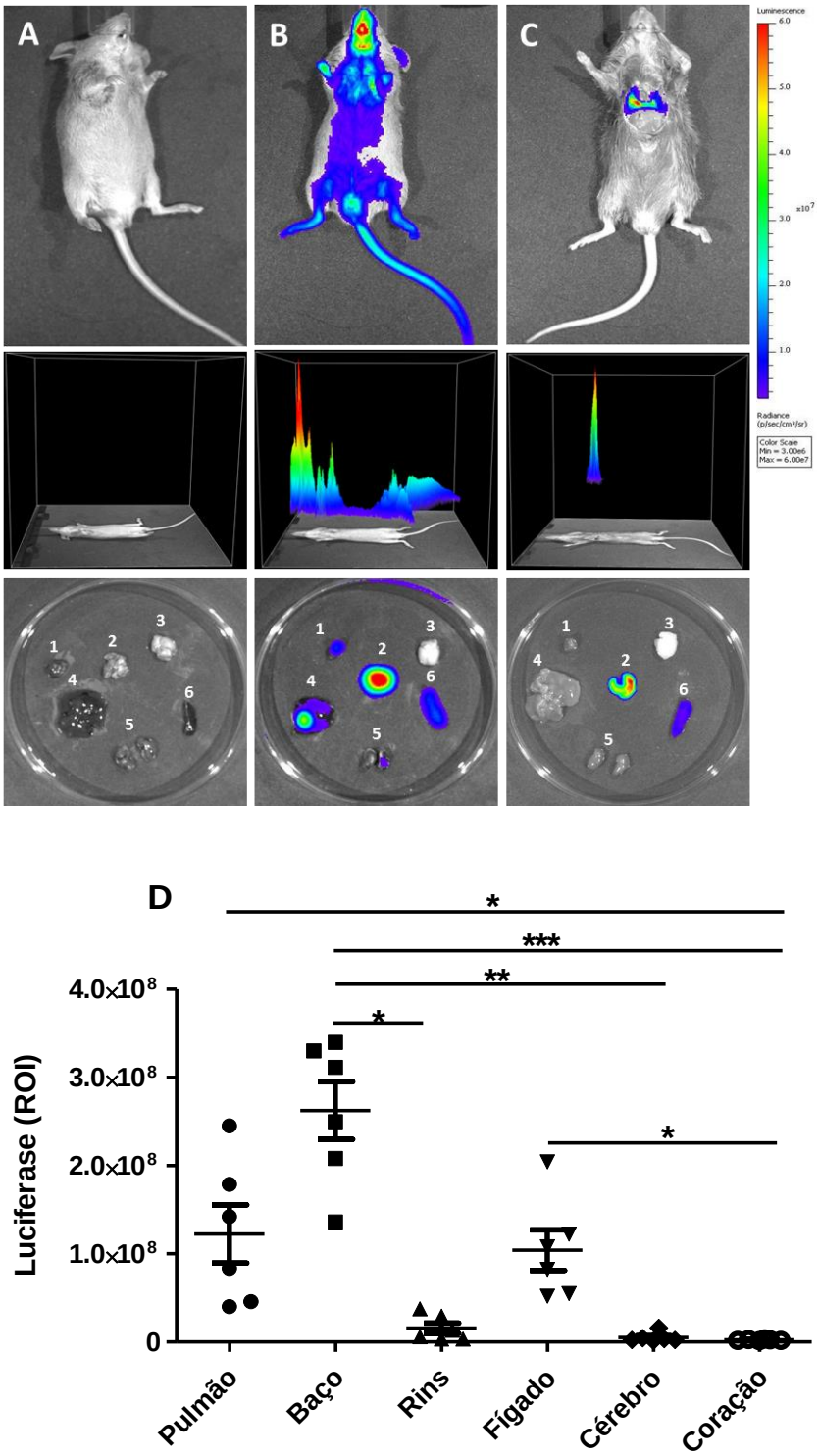

Figura 18 - Distribuição da bioluminescência de *Plasmodium berghei* ANKA luciferase em camundongos DBA/2.
Imagens representativas de camundongos não infectado (A) e infectado ao 7º dia após infecção (B e C), após a administração de luciferina; Em (B) observa-se eritrócitos parasitados distribuídos amplamente na corrente sanguínea e em (C) acumulados nos diferentes órgão após a perfusão com PBS 1 x. Quantificação da bioluminescência dos órgãos isolados (D). Dados representativos de 2 experimentos (n= 6 por grupo) expressos com média ± SEM (Teste Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's, onde *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). 1. Coração; 2: pulmões; 3: cérebro; 4: fígado; 5: rins; 6: baço. Imagens capturadas e analisadas no aparelho IVIS Spectrum.

Ainda, observamos que animais infectados com PbA-L no 7º dpi com efusão pleural (hidrotórax), apresentavam maior quantidade de EP aderidos nos pulmões, em relação aos animais sem efusão pleural (Figura 19), indicando novamente que a citoadesão pode estar associada ao desenvolvimento da síndrome respiratória aguda associada à malária, publicado em (SERCUNDES et al., 2016).

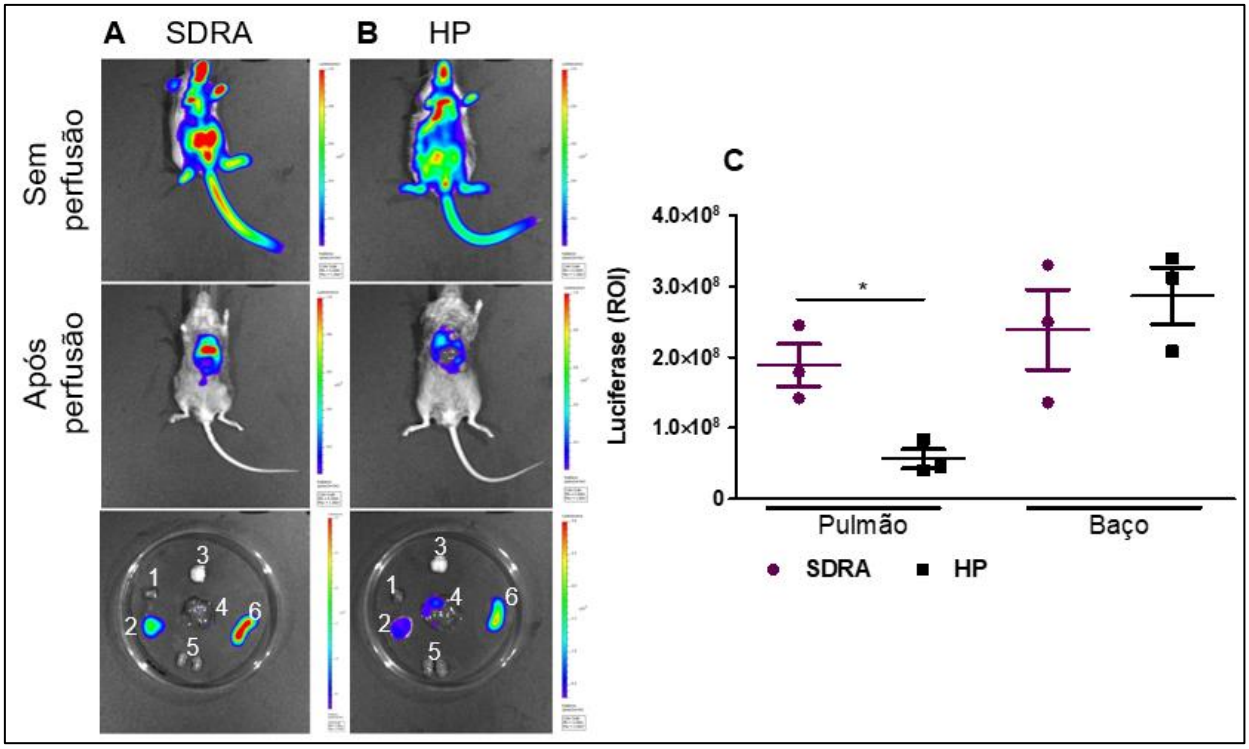

Figura 19 - Distribuição da bioluminescência de *Plasmodium berghei* ANKA luciferase em animais com SDRA e HP.
Imagens representativas de camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA luciferase no 7º dia pós-infecção e após a administração de luciferina de um camundongo que desenvolveu SDRA (com hidrotórax) (A) e de um camundongo DBA/2 que apresentou HP (sem hidrotórax) (B). Luminescência observada nos órgãos isolados de DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA luciferase e perfundidos com PBS 1 x (C). Dados representativos de 2 experimentos (n=3 por grupo) expressos com média ± SEM (TesteT onde *p<0,05). 1: Coração; 2: pulmões; 3: cérebro; 4: fígado; 5: rins; 6: baço. Imagens capturadas e analisadas no aparelho IVIS Spectrum. SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo; HP: hiperparasitemia.

5.1.3 Marcação de ICAM, VCAM e CD36 por imunoistoquímica

Sabendo que ocorre maior adesão de eritrócitos parasitados nos pulmões de camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA que desenvolvem

SDRA em relação aos que desenvolvem hiperparasitemia, estudamos o papel das moléculas de adesão previamente conhecidas na citoadesão de eritrócitos infectados por plasmódios (ICAM-1, VCAM e CD36) (CABRERA; NECULAI; KAIN, 2014; CUNNINGHAM et al., 2017; FATIH et al., 2012; LOVEGROVE et al., 2008). Estas moléculas foram analisados nos tecidos pulmonares de animais eutanasiados no 7º dia pós-infecção e classificados em SDRA ou HP de acordo com o modelo preditivo (ORTOLAN et al., 2014) por imunoistoquímica.

Houve marcação de ICAM-1, VCAM e CD36 em macrófagos alveolares e em células endoteliais tanto em animais não infectados (em menor quantidade), quanto em animais classificados com SDRA e HP (Figura 20 A). Entretanto, a área de marcação para ICAM-1 foi maior nos pulmões de animais SDRA em relação a animais HP ou NI (Figuras 20 A e 20 B). A marcação de VCAM também foi maior nos pulmões de animais SDRA em relação a animais NI, porém não houve diferença significativa entre animais SDRA e HP, mas houve diferença entre animais HP e NI (Figuras 20 A e 20 C).

Já em relação a molécula CD36, foi observada uma maior marcação nos pulmões de animais SDRA e HP em relação aos animais não infectados. Entretanto, esta foi maior nos pulmões dos camundongos HP quando comparado com animais SDRA (Figuras 20 A e 20 D).

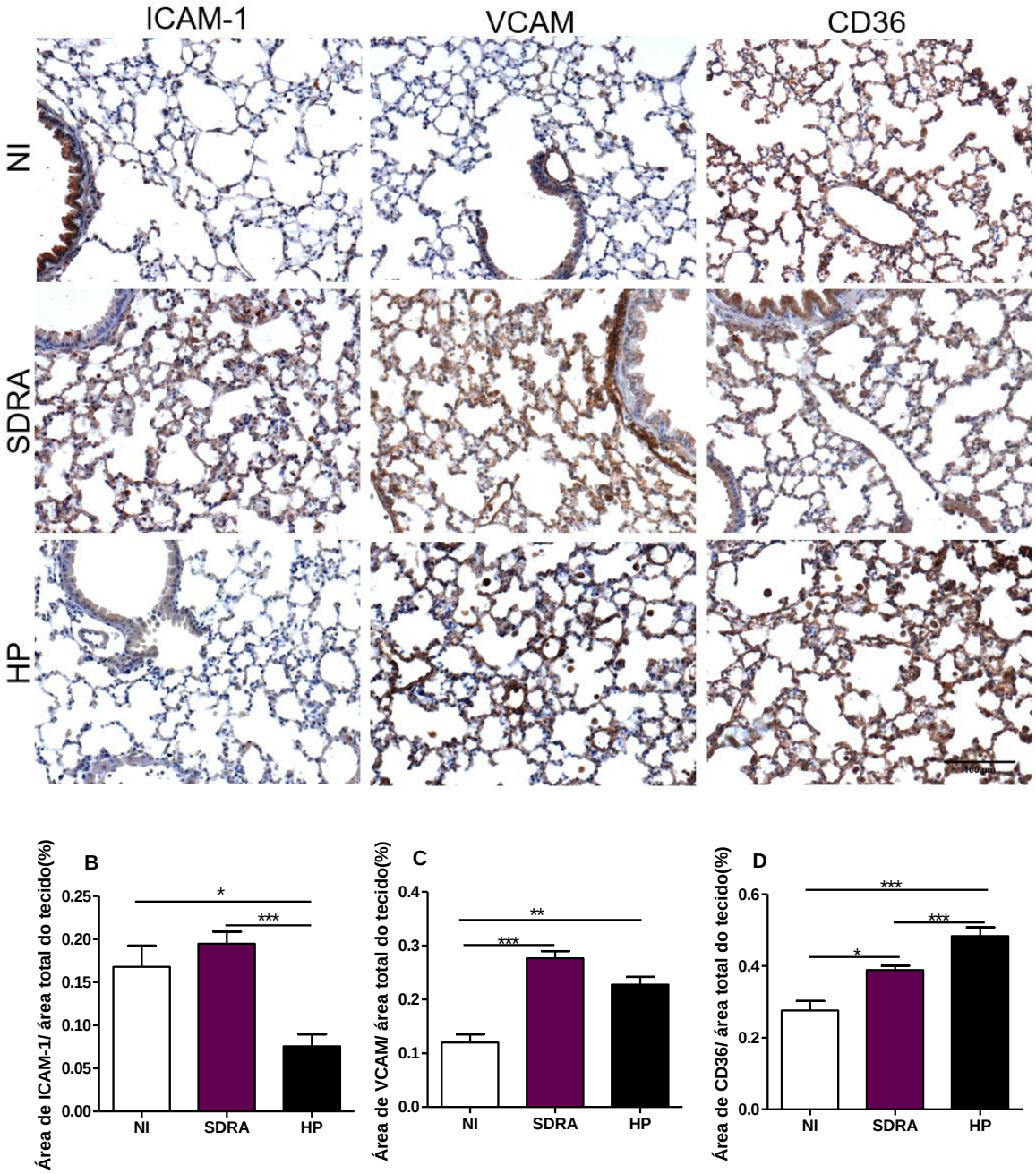

Figura 20 - Imunoistoquímica para marcação de ICAM-1, VCAM e CD36 em pulmões de camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.
Os pulmões foram coletados no 7º dia pós-infecção e os animais classificados de acordo com o modelo preditivo. É possível observar a marcação de ICAM-1, VCAM e CD36 em animais SDRA e animais HP em macrófagos alveolares e em células endoteliais (A). A quantificação da área de marcação específica/ área total de tecido pulmonar, sendo ICAM-1 (B), VCAM (C) e CD36 (D). Imagens capturadas no aumento de 200 vezes e analisadas através do software ImageJ. Barra de escala: 100 µm. Dados apresentados como média ± SEM, teste de Kruskal-wallis, seguido pelo pós teste de Dunn's (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). NI: não infectado; SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo; HP: hiperparasitemia.

5.1.4 Dexametasona previne a SDRA associada à malária, mas não altera a sobrevivência em camundongos DBA/2

Camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foram tratados com dexametasona para avaliar a interferência de um anti-inflamatório esteroidal no desenvolvimento da síndrome respiratória aguda.

Apesar do tratamento com dexametasona não ter alterada a frequência respiratória (FR), os animais apresentaram uma melhora do volume tidal (VT) e também uma diminuição do aumento da pausa respiratória (Penh) (Figura 21 A, B e C), demonstrando desta forma, uma melhora capacidade respiratória.

Entretanto, os animais tratados apresentaram maior parasitemia periférica, apesar de não ocorrer diferença significativa na sobrevivência dos mesmos em relação aos controles infectados e não tratados.

Porém, na análise histológica pulmonar efetuada no 7º dia pós-infecção, foi observado que os animais tratados com dexametasona apresentaram pulmões íntegros, com menor espessamento dos septos alveolares, diminuição do infiltrado inflamatório, além de ausência de hemorragias e edema pulmonares e efusão pleural, observados por macroscópica (Figura 21 G), em comparação aos animais não tratados (Figura 21 F).

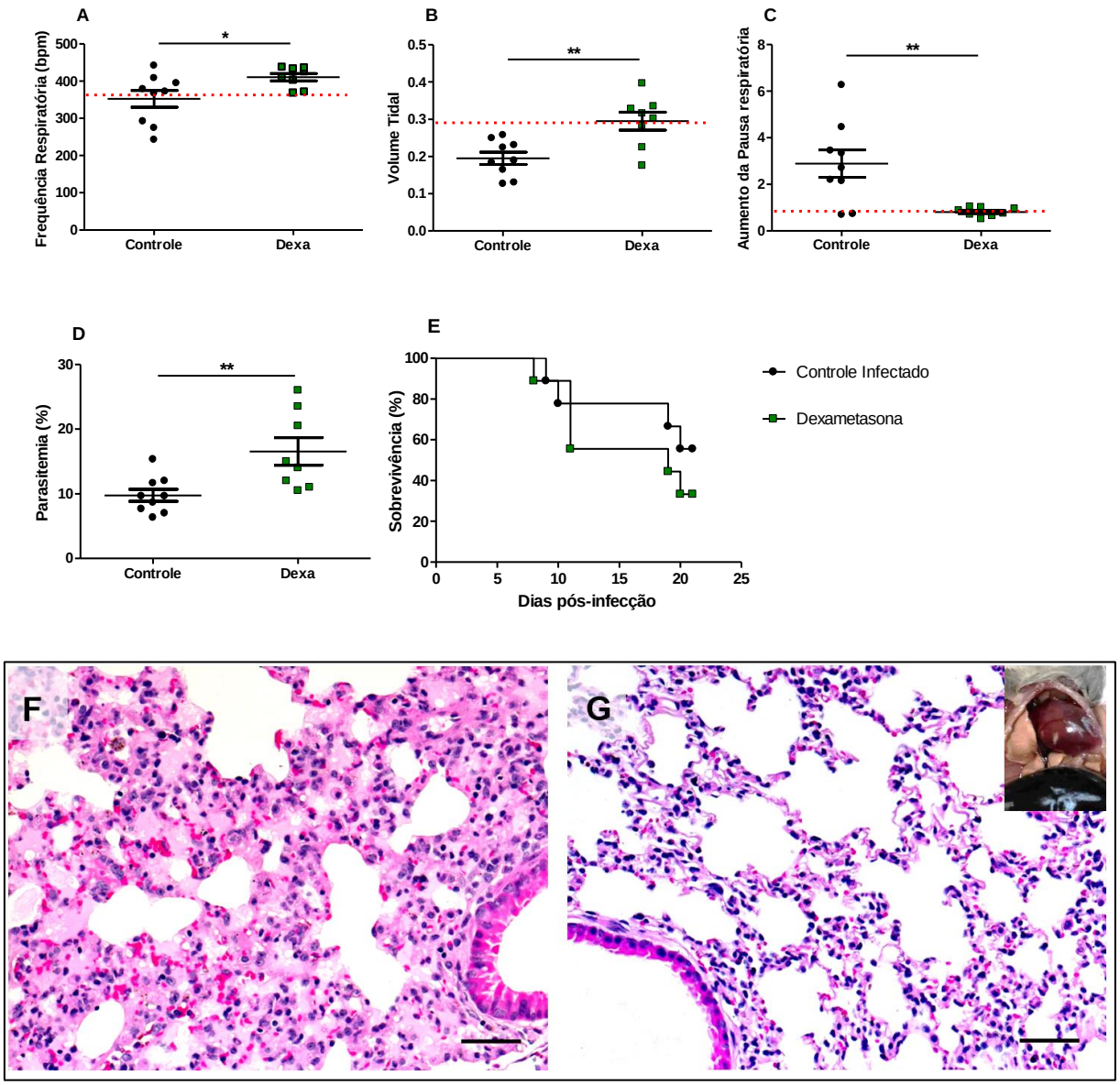

Figura 21 - Perfil respiratório, parasitemia, sobrevivência e análise histológica de camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com dexametasona.
Frequência Respiratória (A), volume tidal (B), aumento da pausa respiratória Penh (C) e parasitemia (D) no 7º dia pós infecção (dpi) e, curva de sobrevivência (E). Imagens representativas de pulmões de animais não tratados no dia de morte (20º dpi) (F) ou tratados com dexametasona no dia da eutanásia (7º dpi). O tratamento com dexametasona (80 mg/kg) foi realizado nos dias 4, 5 e 6 pós-infecção (G). Coloração H&E. Aumento 200 vezes. Barra de escala: 50 µm. Dados representativos de 2 experimentos (n=9 controle; 8 dexametasona) expressos com média ± SEM (Teste Mann Whitney e Log-rank). bpm: batimentos por minuto; Dexa: dexametasona. Linha tracejada representa a média dos valores de animais não infectados.

Ainda, foi observado que os animais tratados com dexametasona apresentaram menores concentrações séricas de TNF, IL-6 e IL-33 em relação aos animais do grupo controle (infectados e não tratados), e não houve alteração nos

níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, indicando que, de fato, a dexametasona reduz o processo inflamatório no nosso modelo experimental para SDRA (Figura 22).

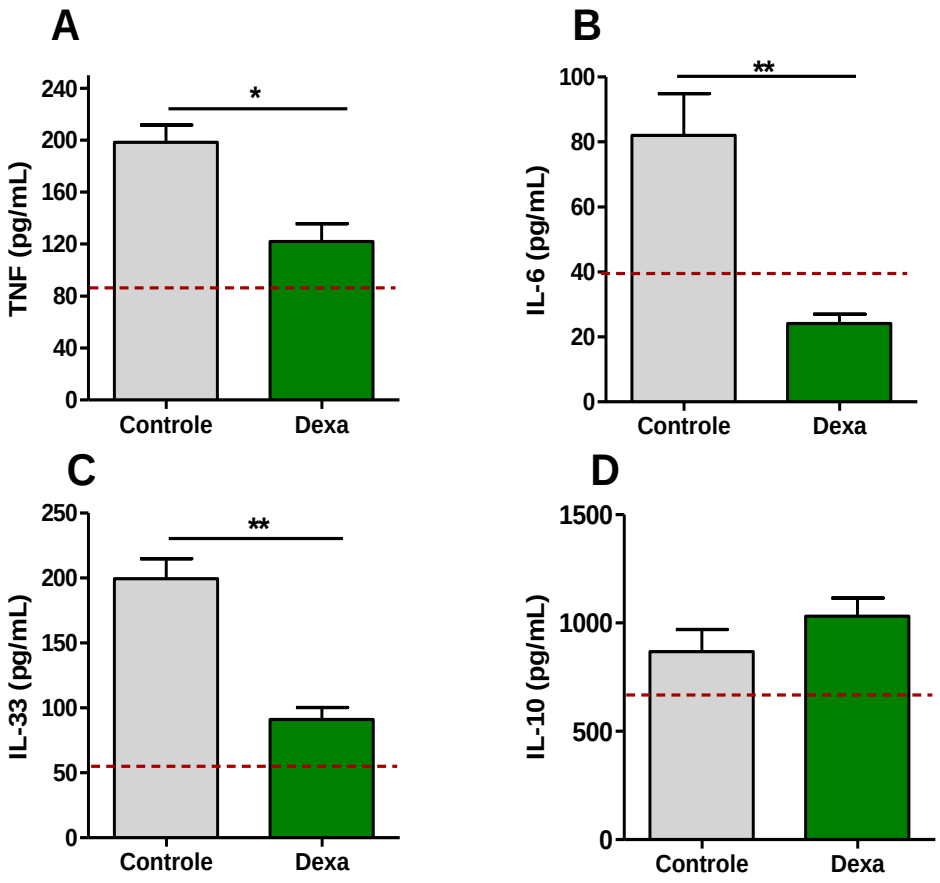

Figura 22 – O tratamento com dexametasona reduz os níveis séricos de TNF, IL-6 e IL-33 em camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.
Níveis séricos de TNF (A), IL-6 (B), IL-33 (C) e IL-10 (D) coletados no 7º dia pós-infecção em animais tratados com dexametasona (80 mg/kg) nos dias 4, 5 e 6 pós-infecção. Foi observada redução nos níveis séricos de TNF, IL-6 e IL-33 no soro dos animais tratados em relação aos animais não tratados, entretanto, não houve diferença nos níveis de IL-10. Dados representativos de 2 experimentos independentes (n=5 por grupo) expressos com média ± SEM (Teste Mann Whitney e Log-rank, *p<0,05 e **p<0,01). Técnica de ELISA. Linha tracejada representa a média dos valores de animais não infectados. Dexa: dexametasona.

Ao avaliarmos a carga parasitária nos pulmões de animais infectados tratados ou não com dexametasona, verificamos que embora os animais tratados não desenvolveram a SDRA, a dexametasona aumentou a expressão gênica de EP-PbA (18s) nos pulmões destes animais, em relação aos não tratados (Figura 23 A). Também observamos uma grande quantidade de pigmento malárico (hemozoína) no interior de eritrócitos parasitados e células inflamatórias (Figura 24).

Apesar de ter sido observado a diminuição na concentração sérica de TNF (Figura 23 A), a expressão gênica desta citocina não foi alterada (Figura 23 B) e

também não houve alteração na expressão gênica de ICAM-1 (Figura 23 C) em animais tratados com a dexametasona.

Entretanto, a expressão gênica de CD36 nos pulmões tanto de animais tratados quanto não tratados diminuiu em relação aos animais não infectados, apesar de ser maior em animais tratados com a dexametasona. Acreditamos que essa alteração provavelmente não tenha efeitos biológicos. (Figura 23 E).

A expressão gênica de EPCR nos pulmões de animais tratados com dexametasona foi reduzida em relação aos animais-controle (infectados não tratados) (Figura 23 F). Por último, não foram observadas modificações na expressão de Ncf2 e CD68 que são marcadores específicos para neutrófilos e monócitos respectivamente.

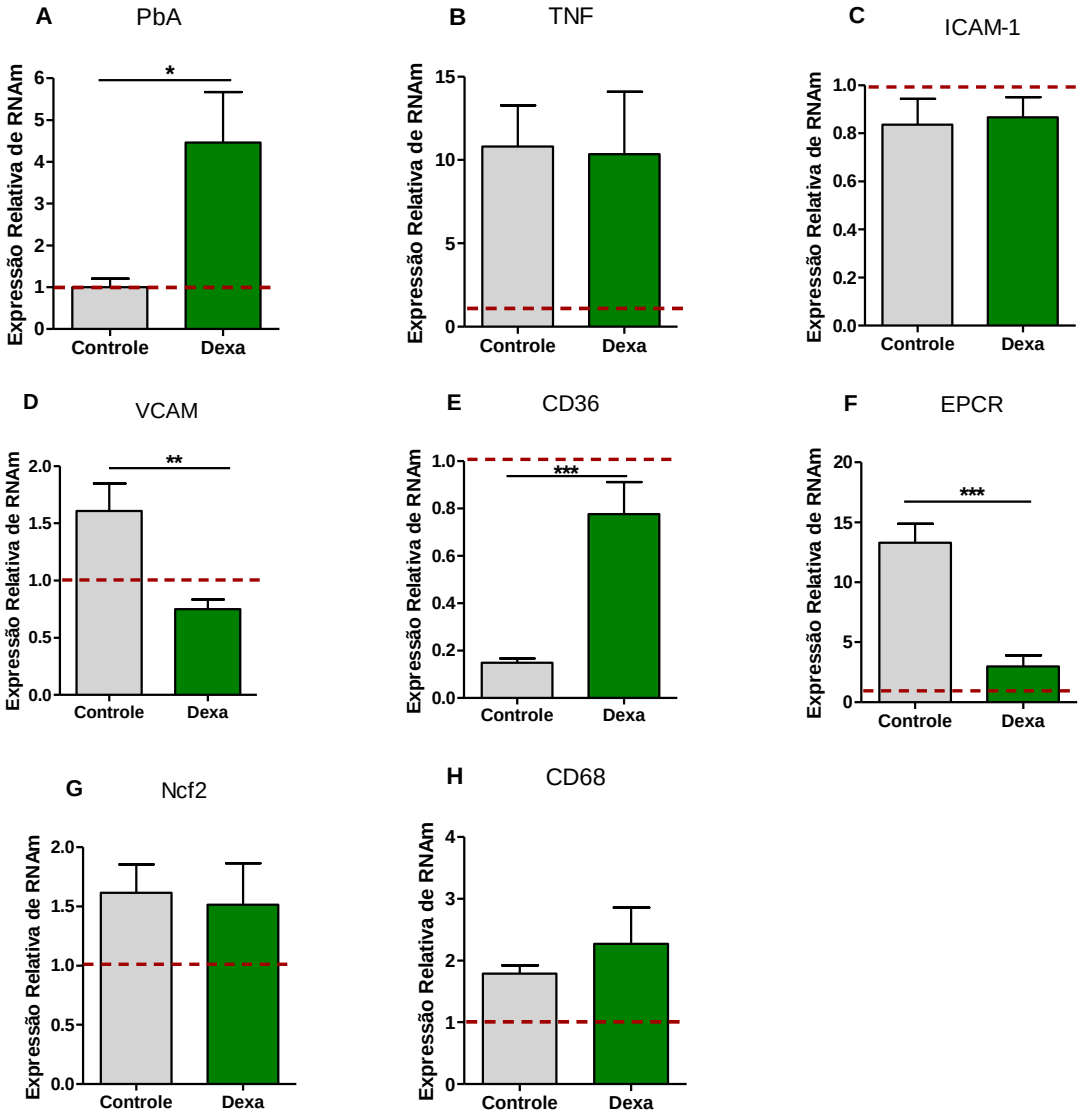

Figura 23 - Tratamento com dexametasona altera a expressão gênica de *Plasmodium berghei* ANKA e EPCR em pulmões de camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

Expressão gênica de *Plasmodium berghei* ANKA 18s – PbA (A), TNF (B), ICAM-1 (C), VCAM (D), CD36 (E), EPCR (F), Ncf2 (G) e CD68 (H) nos pulmões de camundongos no 7º dia pós-infecção, tratados com dexametasona (80 mg/Kg; 3 doses) ou não (controle). Valores obtidos por PCR em tempo real, analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e expressos em número de vezes aumentado em relação à média dos animais não infectados (linha tracejada). Dados representativos de 2 experimentos agrupados (n=9 controle; 8 dexametasona) expressos com média ± SEM (Teste-T *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Dexa: dexametasona.

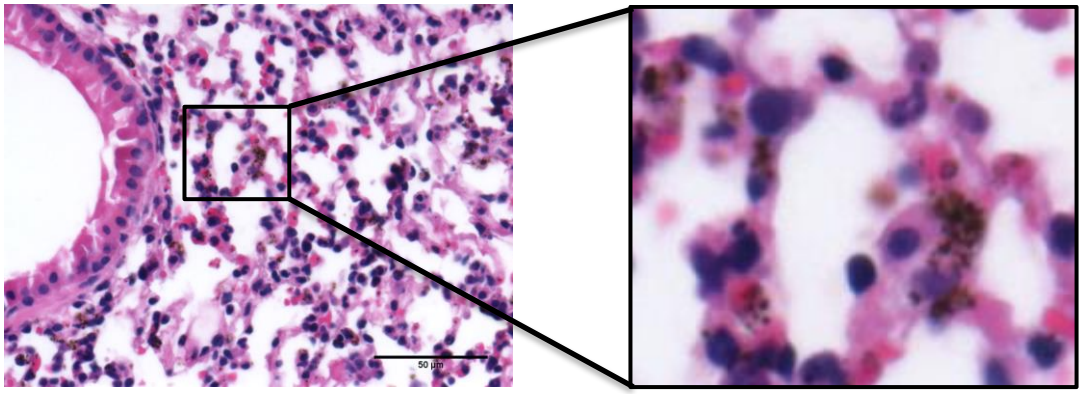

Figura 24 - A hemozoína acumula em pulmões de camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados com dexametasona.
A imagem representativa demonstra grande quantidade de pigmento malárico no parênquima pulmonar, especialmente em eritrócitos parasitados e em células inflamatórias. Coloração H&E. Aumento 400 vezes.

5.1.5 Dexametasona protege a barreira alvéolo-capilar em camundongos DBA/2 infectados com Plasmodium berghei ANKA

Uma vez que foi observado que a dexametasona melhora os parâmetros respiratório, as lesões pulmonares e diminui a expressão gênica de EPCR pulmonar, nos perguntamos se este fármaco seria capaz de diminuir a permeabilidade vascular.

Os animais tratados com dexametasona mostraram menor peso pulmonar e menor concentração de azul de Evans, indicando diminuição da permeabilidade vascular pulmonar, quando comparados com animais controles não tratados (Figura 25).

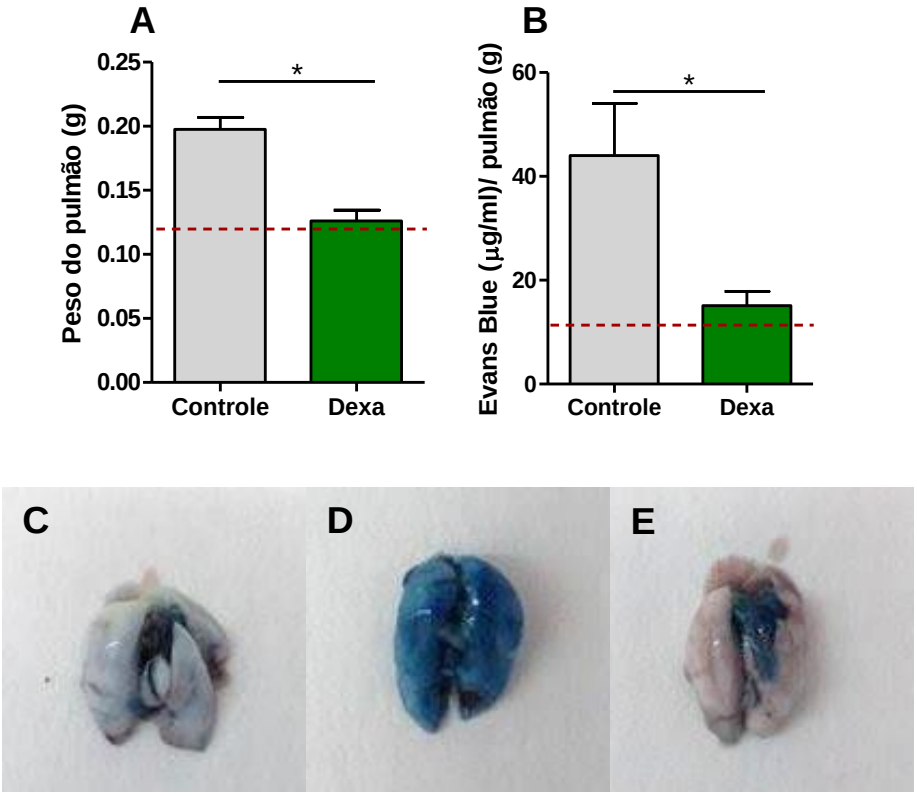

Figura 25 - Dexametasona diminui a permeabilidade vascular pulmonar em camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados com dexametasona no 7º dia após-infecão.
Tratamento com dexametasona reduziu o peso dos pulmões nos animais infectados (A) e apresentou diminuição da permeabilidade vascular pulmonar identificada por uma menor marcação por azul de Evans (B). Imagens representativas dos pulmões dos animais não infectados (C), controle infectados (D) e infectados tratados com dexametasona (E). Dados representativos de dois experimentos independentes (n=4 por grupo) expressos com média ± SEM (Teste Mann Whitney). (*p>0,5). Linha tracejada representa a média dos valores de animais não infectados. Dexa: dexametasona.

5.2 Caracterização das Células Endoteliais Pulmonares Primárias

Para avaliar a citoadesão, a expressão de moléculas de adesão e o papel de fatores inflamatórios e da permeabilidade vascular de maneira mais controlada, ou seja, sem a interferência de fatores sistêmicos do próprio camundongo, nós utilizamos eritrócitos parasitados por *Plasmodium berghei* ANKA (EP-PbA) em culturas primárias de células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2) (CHEN; FEI; LI, 1995; LOIOLA et al., 2013, 2015).

As células endoteliais pulmonares primárias foram inicialmente analisadas por morfologia, valendo-se da microscópia de fase invertida. Em três dias de cultura, foi possível observar células desprendendo-se e migrando dos fragmentos de tecido

pulmonar (Figura 26 A). Já com sete dias de cultura, foi possível observar uma grande quantidade de células com aspecto de paralelepípedos característico de células endoteliais (CHEN; FEI; LI, 1995; LOIOLA et al., 2013) (Figura 26 B).

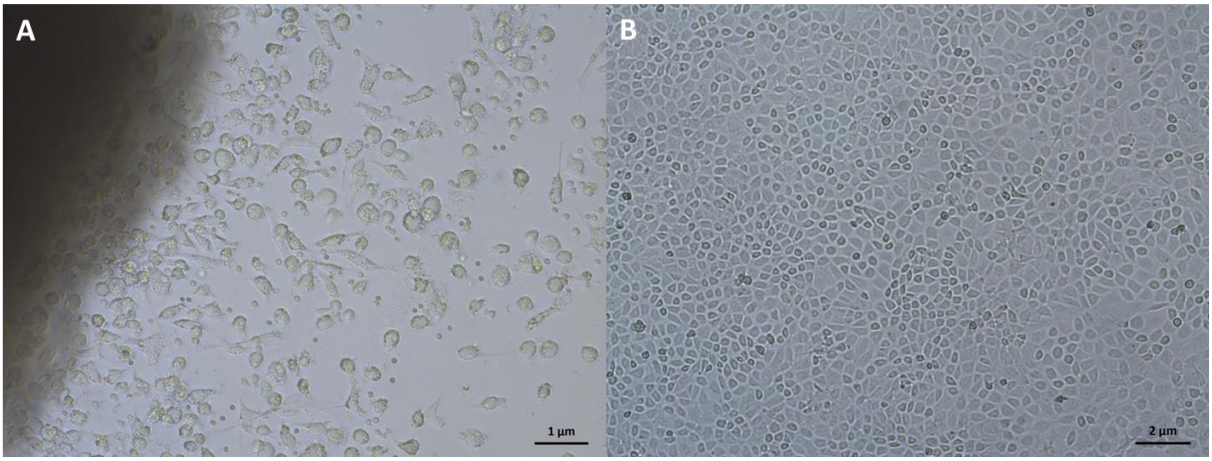

Figura 26 – Aspecto morfológico das células endoteliais pulmonares primárias.
Cultura de células endoteliais com 3 dias, observa-se as células se desprendendo do tecido pulmonar (aumento 200 vezes) (A). Cultura de células endoteliais com 7 dias, observa-se as células com aspecto característico de paralelepípedos (aumento 100 vezes) (B).

Posteriormente, as CEPP-DBA/2 foram caracterizadas por citoquímica e imunocitoquímica através de um painel de marcadores para as células endoteliais (*Lectina de Ulex europease*, fator de von Willembrand, CD31, CD62E, ACE e eNOS) (EL-ASSAAD et al., 2013; LOIOLA et al., 2013). Esses ensaios de imunofluorescência para caracterização das CEPP-DBA/2 demonstraram marcações positivas para todos os anticorpos específicos citados acima (anti-vWF, anti-VCAM, anti-ACE, anti-CD62E, anti-eNOS, anti-CD31 e anti-VE-caderina), indicando que as células isoladas dos pulmões de camundongos DBA/2 são verdadeiramente células endoteliais e que mantêm características estruturais e funcionais de células endoteliais. Além disso, estes resultados mostraram alta pureza na cultura e ausência de células contaminantes, como por exemplo, fibroblastos e células musculares (Figura 27).

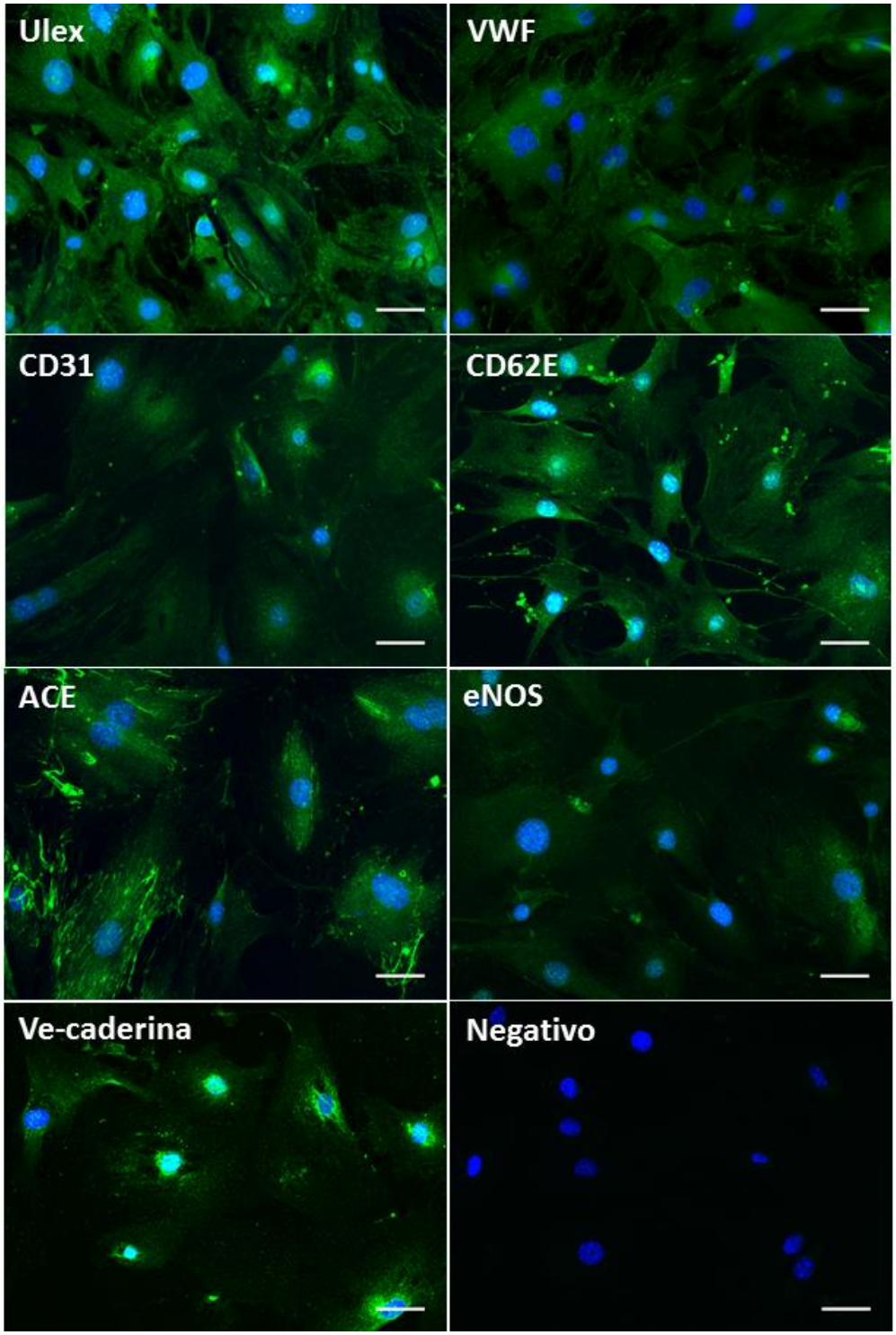

Figura 27 – Caracterização de culturas primárias de células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2.
Marcação de Lectina de *Ulex europease* e de vWF, CD31, CD62E, ACE, eNOS, Ve-caderina por imunocitoquímica. Controle Negativo foi realizado com anticorpo secundário alexa fluor 488. Núcleo marcado em azul com Hoechst 33342. Aumento 200 vezes. Barra de escala: 50 µm.

5.2.1 Verificação da Atividade Mitocondrial e da Viabilidade Celular

Com o objetivo de verificar a atividade mitocondrial e, consequentemente, a viabilidade das CEPP-DBA/2 frente aos diferentes estímulos (EnP, EP, Extrato, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS) e nos diferentes tempos analisados (1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas), estas células foram submetidas ao ensaio de MTT.

Os diferentes tipos de estímulo e tempos de exposição não as impediram de reduzir MTT a formazan, uma vez que todas as amostras apresentaram pico de absorbância máxima próximo a 570 nm. Portanto, não alteraram a atividade mitocondrial das CEPP-DBA/2 em relação as células não estimuladas, indicando que as células continuaram viáveis (Figura 28). Observamos apenas discreta diminuição na atividade mitocondrial nas células estimuladas com LPS por 3 horas em relação às células não estimuladas (Figura 28 B).

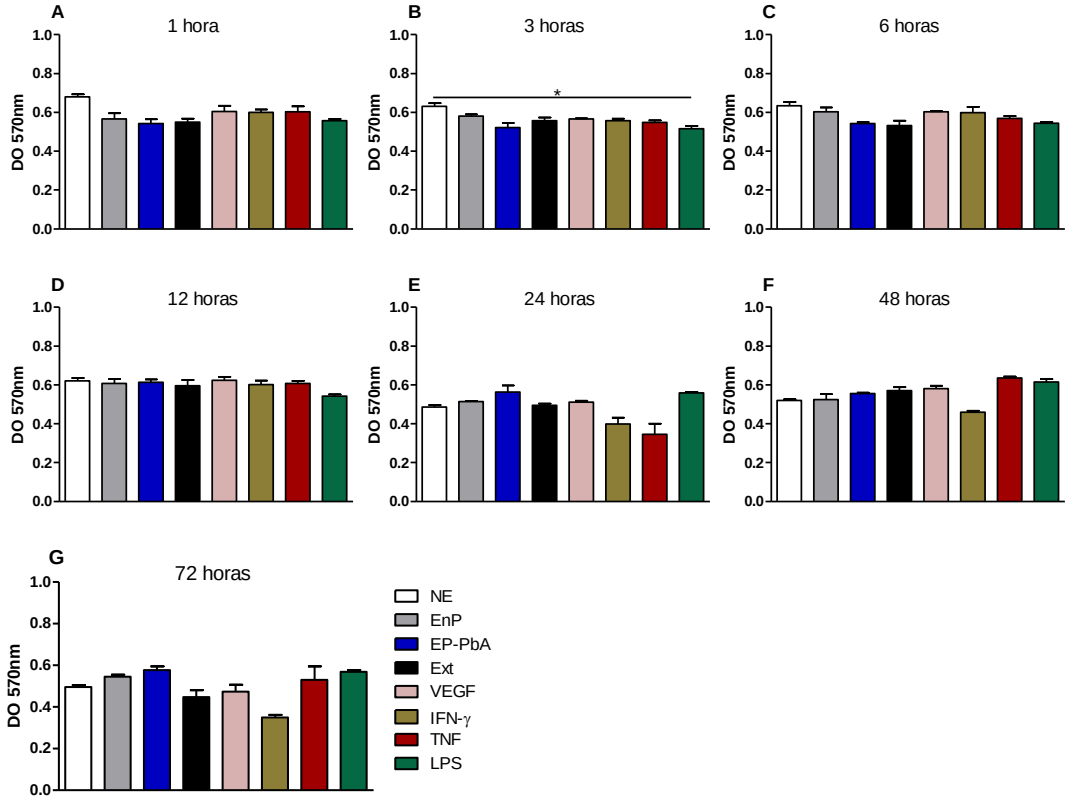

Figura 28 - Células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 tratadas com diferentes estímulos e em diferentes tempos permanecem viáveis de acordo com a técnica de MTT.
Ensaio de atividade mitocondrial e viabilidade celular por MTT em células estimuladas por 1 hora (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E), 48 horas (F) e 72 horas (G). Dados representativos de 2 experimentos independentes (n=3 por estímulo e por tempo) expressos com média ± SEM (Teste Kruskal-wallis, onde *p<0,05). NE: não estimulado; EP-PbA: eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA; EnP: eritrócito não parasitado. Ext: extrato do *Plasmodium berghei* ANKA. DO: densidade óptica.

A viabilidade celular também foi confirmada por citometria de fluxo (Facs Canto) onde foi avaliada a porcentagem de células endoteliais pulmonares primárias (CEPP) marcadas com 7-AAD durante 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de estímulo. Houve apenas uma pequena quantidade de células mortas marcadas com 7-AAD (porcentagem máxima de 11 %) entre os diferentes tempo e estímulos (Figura 29).

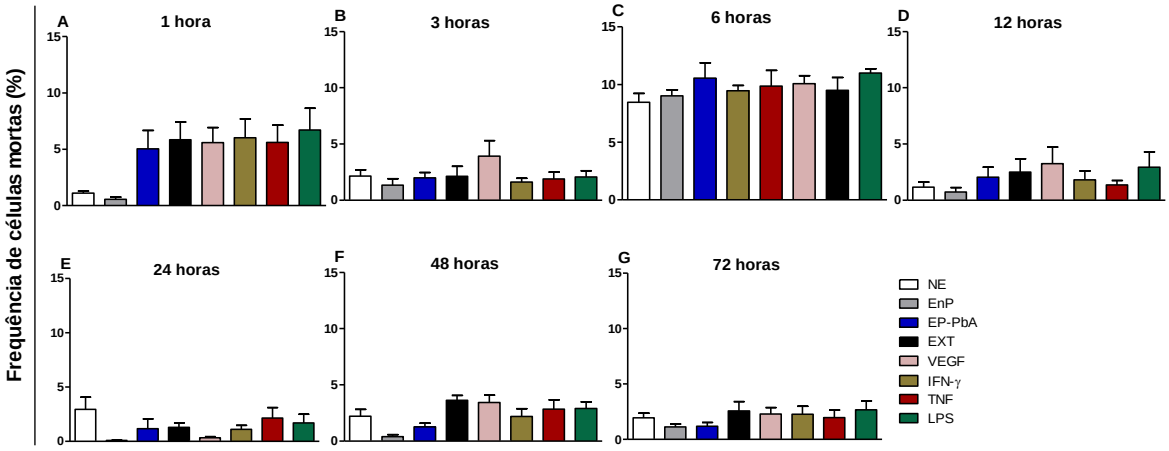

Figura 29 - Células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 tratadas em diferentes tempos e com diferentes estímulos permanecem viáveis de acordo com a marcação de 7AAD por citometria de fluxo.
Frequência de células mortas marcadas com 7AAD em ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo. As células foram estimuladas por 1 hora (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E), 48 horas (F) e 72 horas (G). Dados representativos de 2 experimentos independentes (n=3 por estímulo e por tempo) expressos com média ± SEM (Teste Kruskal-wallis, onde *p<0,05). NE: não estimulado; EP-PbA: eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA; EnP: eritrócito não parasitado. Ext: extrato de *Plasmodium berghei* ANKA.

5.2.2 Células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 produzem VEGF

Apesar do baço ser o grande produtor de VEGF em DBA/2 que apresentam SDRA (EPIPHANIO et al., 2010), hipotetizamos se as CEPP seriam capazes de produzir VEGF e, portanto, contribuir na patogênese da SDRA. Para tal, investigamos a produção do VEGF em diferentes *time-points* com eritrócitos não parasitados (EnP), eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA (EP-PbA), extrato do parasita (Ext), IFN-γ, TNF e LPS. Nossos resultados indicaram que a produção de VEGF detectada em sobrenadantes de CEPP-DBA/2 é tempo-dependente tanto em células não estimuladas (NE) quanto frente aos diferentes

estímulos (LPS, TNF, IFN-γ, Extrato do parasita, EP e EnP). Entretanto, vale destacar que não houveu diferenças entre as células não estimuladas ou estimulados com EP-PbA ou fatores inflamatórios, apesar do LPS ter aumentado esta produção em 24 e 72 horas de estímulo (Figura 30 A e C).

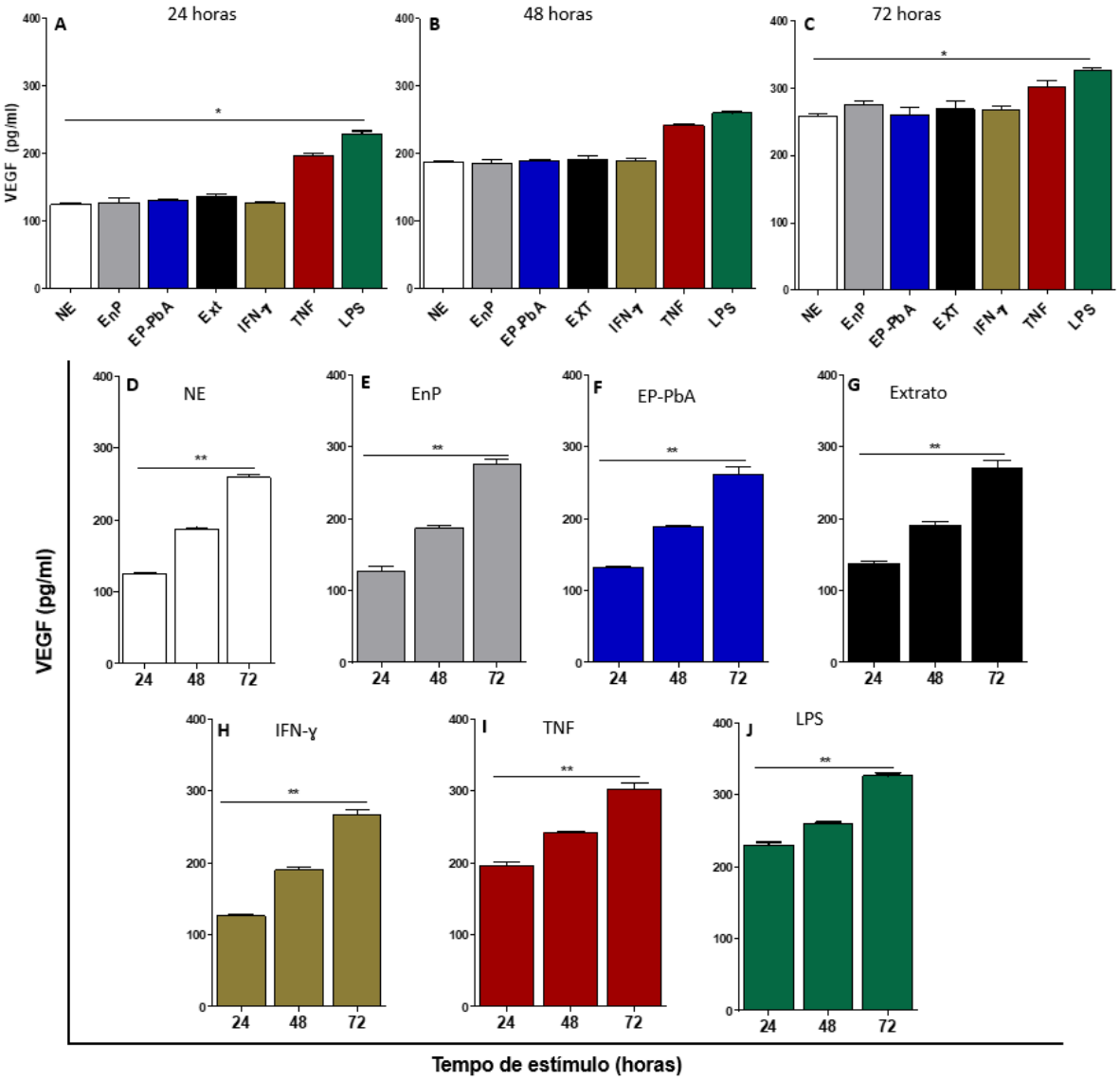

Figura 30 - Células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 produzem VEGF e a produção é independente do estímulo.
Quantificação de níveis de VEGF em sobrenadantes de culturas de NE ou estimuladas durante 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C) e de acordo com o estímulo em 24, 48 e 72 horas, NE (D), EnP (E), EP-PbA (F), extrato (G), IFN-γ (H), TNF (I) e LPS (J). A quantificação foi realizada pelo método de ELISA. Dados representativos de 2 experimentos independentes (n= 4 por estímulo). Resultados expressos com média ± SEM (Teste Kruskal-wallis, e pós-teste Dunns onde: * p<0,05; ** p< 0,01 e *** p<0,001). NE: não estimulado; EP-PbA: eritrócito parasitado de *Plasmodium berghei* ANKA; Ext: extrato; EnP: eritrócito não parasitado.

5.2.3 GM-CSF, IL1-β, IL-6, KC, MCP-1 e RANTES são produzidos por células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

Para avaliarmos a contribuição das CEPP-DBA/2 no processo inflamatório gerado na SDRA, analisamos primeiramente se as CEPP-DBA/2 produzem citocinas e quimiocinas inflamatórias frente aos diferentes estímulos nos diferentes tempos analisados (1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas). A produção do fator estimulador de colônias, citocinas e quimicionas foi verificada por Citometric Bead Array (CBA) em sobrenadantes de CEPP-DBA/2 frente a diferentes estímulos (LPS 50 µg/ml, IFN-γ 50 ng/ml, TNF 50 ng/ml, VEGF 100 ng/ml, extrato do parasita, EP e EnP) por 1, 3, 12 e 24 horas.

Foi observado que as CEPP-DBA/2 produzem mais GM-CSF quando estimulada com extrato do parasita (Figura 31 C), VEGF (Figura 31 D), IFN-γ (Figura 31 E), TNF (Figura 31 F) e em especial LPS que aumenta cerca de 120 vezes (em 24 horas de estímulo) em relação às células não estimuladas (Figura 31 G).

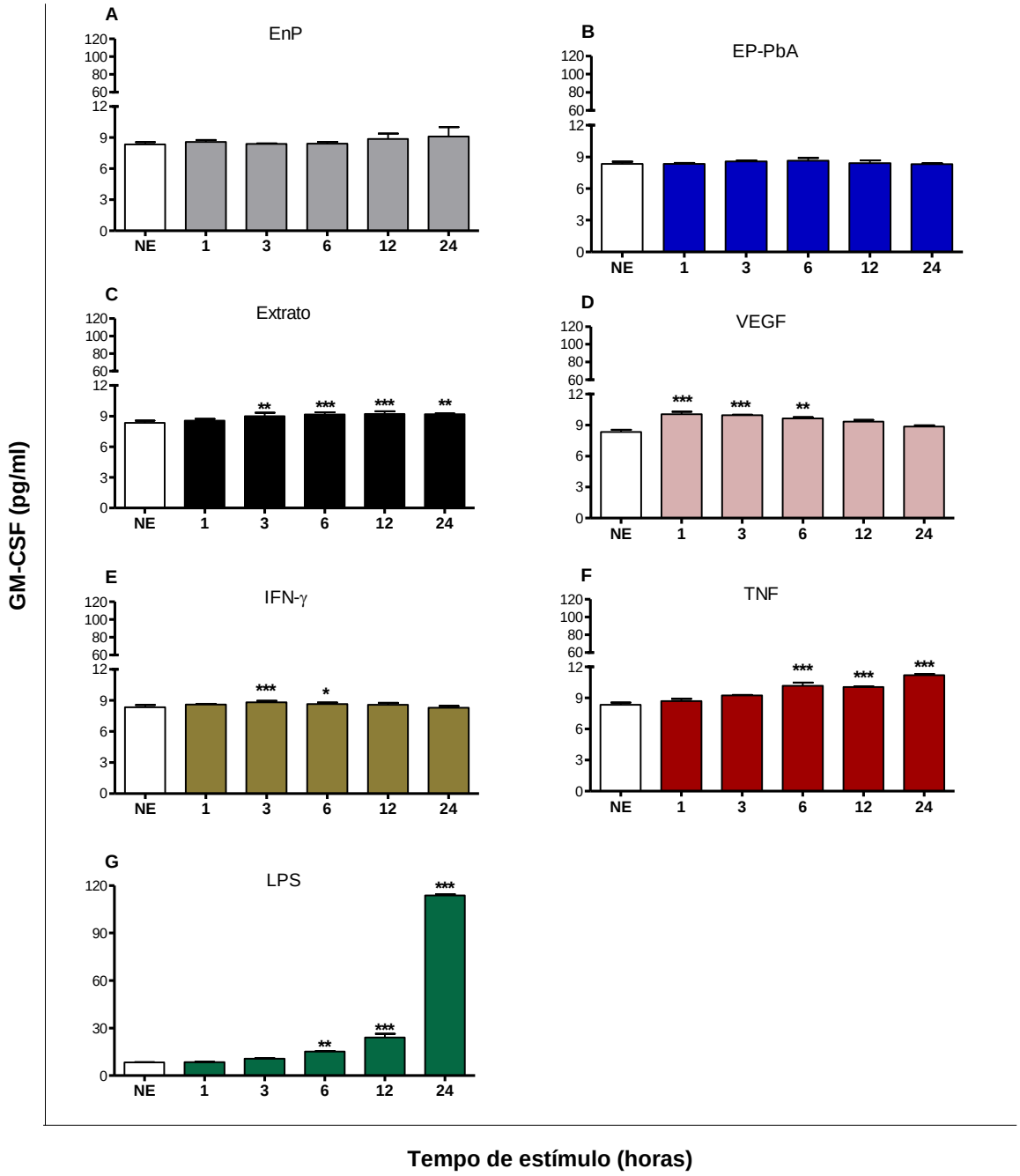

Figura 31 – A produção de GM-CSF em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 aumenta após estímulo com extrato do parasita, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS. Concentração de GM-CSF em CEPP-DBA/2 frente a estímulo por EnP (A), EP-PbA (B), Extrato (C), VEGF (D), IFN-ɣ (E), TNF (F), LPS (G). A quantificação foi realizada pelo método de CBA (BD). Dados referente a um experimento (n= 3 por estímulo; dados apresentados em duplicata). NE: corresponde a média das células não estimuladas em todos os tempos. (Teste Kruskal-wallis, seguido do pós-teste de comparação multipla de Dunns, onde * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação às células não estimuladas). CEPP-DBA/2: células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2; EnP: eritrócito não parasitado; EP-PbA: eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA.

Apesar de ter sido detectado a produção de IL1-β em CEPP-DBA/2, não foi observado diferença na concentração desta citocina em relação às células não estimuladas nos diferentes tempos (Figura 32). Embora tenha sido observado diferença na concentração de IL-1β em células com EnP (Figura 32 A), EP-PbA (Figura 32 B), Extrato (Figura 32 C), IFN-γ (Figura 32 E) e TNF (Figura 32 F) em tempos específicos, a diferença é muito tênue em relação às células não estimuladas.

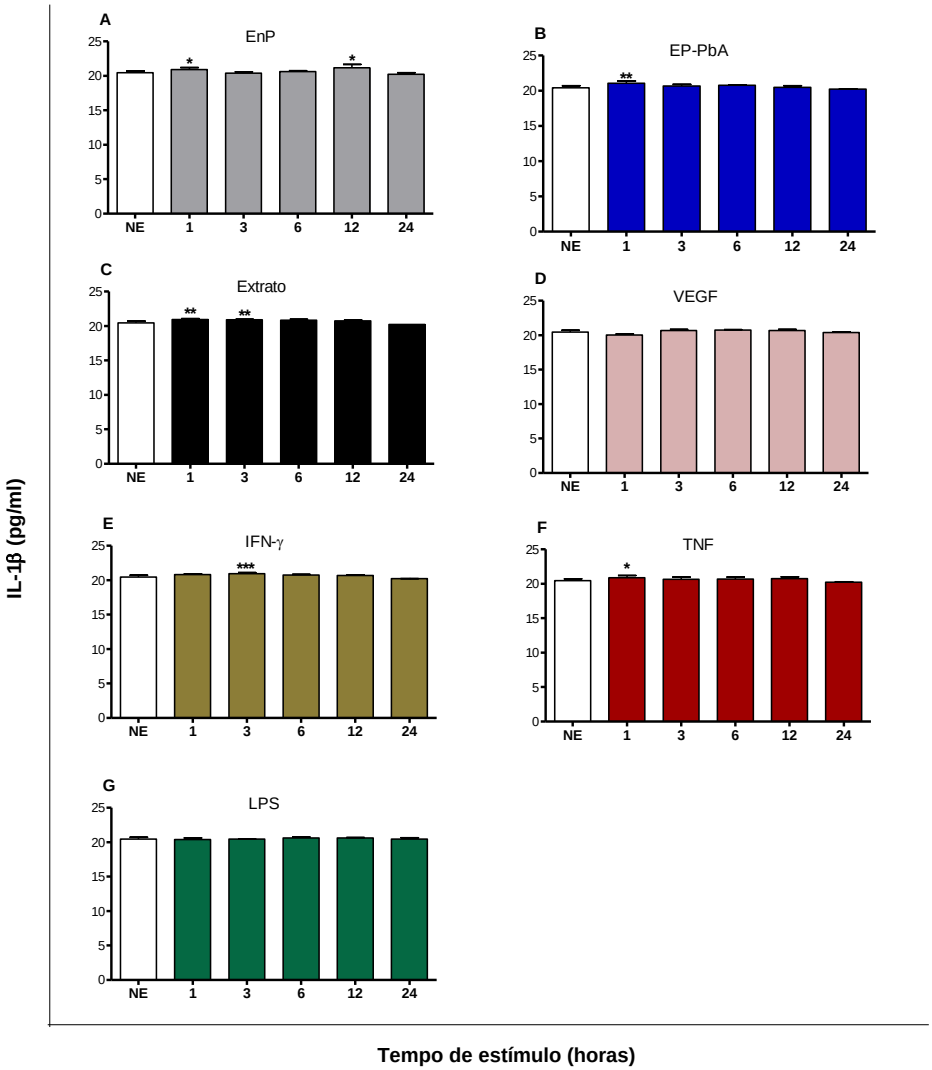

Figura 32 - A produção IL-1β em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 não depende do tempo e do estímulo.
Concentração de IL-1β em CEPP-DBA/2 frente a estímulo por EnP (A), EP-PbA (B), Extrato (C), VEGF (D), IFN-ɣ (E), TNF (F), LPS (G). A quantificação foi realizada pelo método de CBA (BD). Dados referente a um experimento (n= 3 por estímulo; dados apresentados em duplicata). NE: corresponde a média das células não estimuladas em todos os tempos. (Teste Kruskal-wallis, seguido do pós-teste de comparação multipla de Dunns, onde * p<0,05; ** p< 0,01 e *** p<0,001 em relação às células NE). CEPP-DBA/2: células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2; EnP: eritrócito não parasitado; EP-PbA: eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA.

Verificamos que a concentração da IL-6 estava aumentada em CEPP-DBA/2 estimuladas com EnP, EP-PbA, extrato de PbA, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS. Em células estimuladas com VEGF (Figura 33 D), houve diferença estatística em relação às células não estimuladas. Com EnP (Figura 33 A) e EP-PbA (Figura 33 B) observou-se um pico, bastante semelhante, em 12 horas de estímulo, decaindo com 24 horas. Em relação ao extrato de PbA, existiu um pico com 6 horas de estímulo, diminuindo após esse período (Figura 33 C). Já em CEPP-DBA/2 estimuladas com IFN-γ observou-se um pico baixo em células estimuladas entre 3 e 6 horas (Figura 33 E). Já o estímulo com TNF induziu uma produção de IL-6 tempo-dependente (Figura 33 F). Já em relação a LPS, houve um aumento brusco em 3 horas de estímulo, não sendo mais observado após esse período (Figura 33 G).

Esses dados indicam que tanto fatores do parasita (EP-PbA, extrato), quanto IFN-γ, TNF e LPS, são capazes de aumentar a liberação IL-6 por CEPP-DBA/2, e que esta secreção mostrou-se tempo-dependente com TNF (Figura 33).

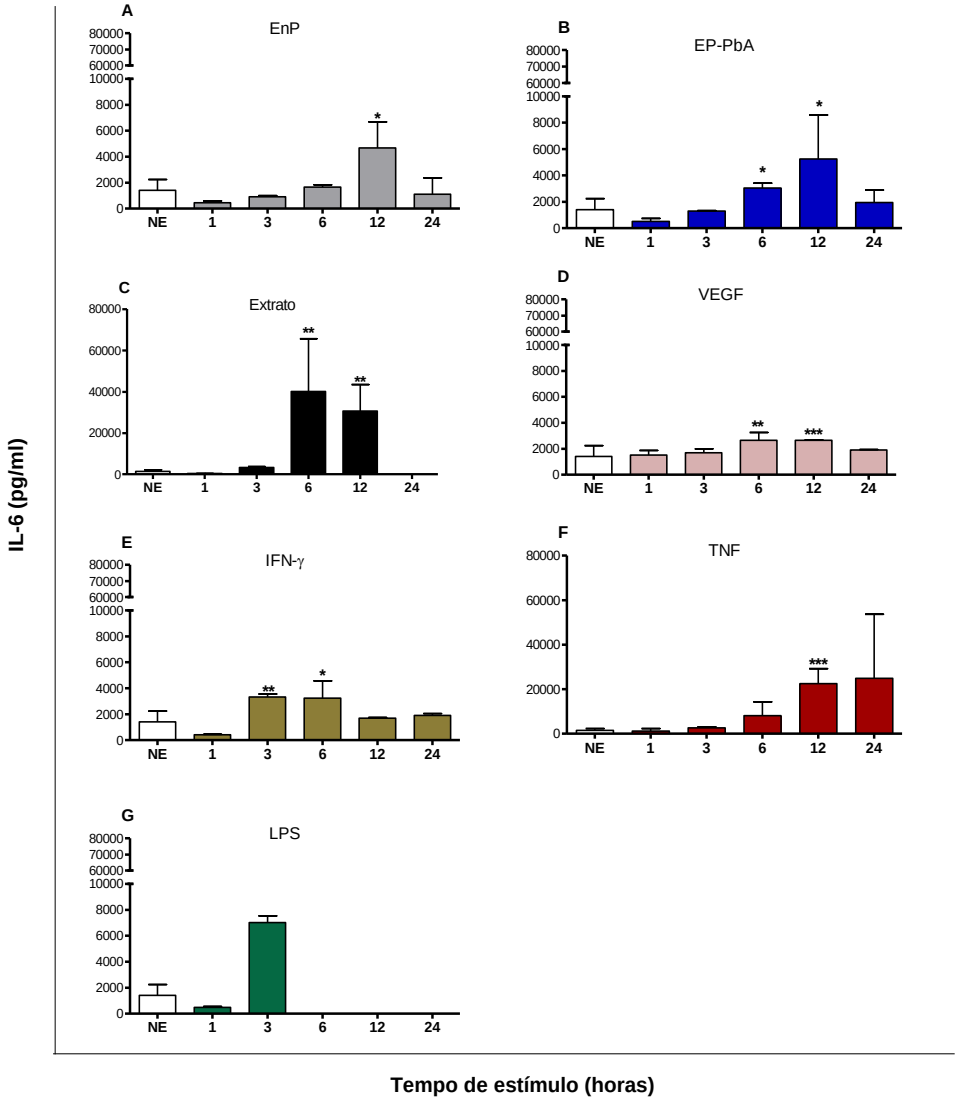

Figura 33 - A produção de IL-6 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 aumenta após estímulo com extrato do parasita, EP-PbA, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS. Concentração de IL-6 em CEPP-DBA/2 frente a estímulo por EnP (A), EP-PbA (B), Extrato (C), VEGF (D), IFN-γ (E), TNF (F), LPS (G). A quantificação foi realizada pelo método de CBA (BD). Dados referente a um experimento (n= 3 por estímulo; dados apresentados em duplicata). NE: corresponde a média das células não estimuladas em todos os tempos. (Teste Kruskal-wallis, seguido do pós-teste de comparação multipla de Dunns, onde * p<0,05; ** p< 0,01 e *** p<0,001 em relação às células NE). CEPP-DBA/2: células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2; EnP: eritrócito não parasitado; EP-PbA: eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA.

Nossos resultados indicam que em CEPP-DBA/2 a liberação de KC foi maior em células estimuladas com EP-PbA por 6 e 12 horas (Figura 34 B). Sendo mais alta ainda em células estimuladas com o extrato de PbA por 6 e 12 horas, chegando a aumentar aproximadamente 800 vezes em 24 horas de estímulo (Figura 34 C).

Também foi observada uma maior liberação em células estimuladas com IFN-γ por 3 e 6 horas de estímulo (Figura 34 E). Além disso, em células estimuladas com

TNF, houve um aumento a partir de 3 horas de estímulo, com um pico de concentração de KC em 6 horas (cerca de 400 vezes) (Figura 34 F) e em células estimuladas com LPS por 3 a 24 horas (Figura 34 G), também houve um aumento na liberação desta quimiocina.

Esses dados indicam que tanto fatores do parasita (EP-PbA, extrato), quanto IFN-γ, TNF e LPS, são capazes de induzir a liberação KC por CEPP-DBA/2, e que esta secreção é tempo-depende com LPS e com o extrato de PbA (Figura 34).

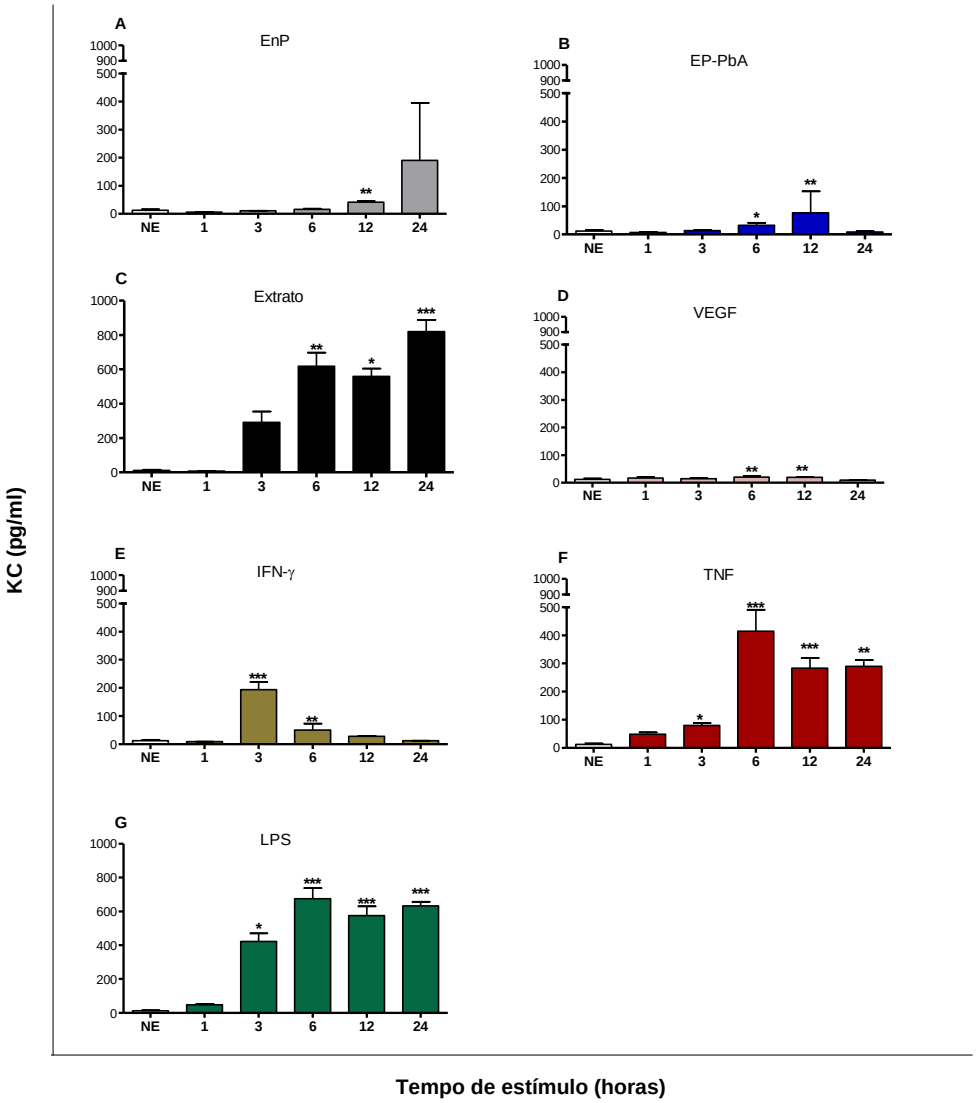

Figura 34 – A produção de IL-6 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 aumenta após estímulo com extrato do parasita, EP-PbA, EnP, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS. Concentração de KC (CXCL1) em CEPP-DBA/2 frente a estímulo por EnP (A), EP-PbA (B), Extrato (C), VEGF (D), IFN-γ (E), TNF (F), LPS (G). A quantificação foi realizada pelo método de CBA (BD). Dados referente a um experimento (n= 3 por estímulo; dados apresentados em duplicata). NE: corresponde a média das células não estimuladas em todos os tempos. (Teste Kruskal-wallis, seguido do pós-teste de comparação multipla de Dunns, onde * p<0,05; ** p< 0,01 e *** p<0,001 em relação às células NE). CEPP-DBA/2: células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2; EnP: eritrócito não parasitado; EP-PbA: eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA.

Nossos resultados indicaram que a concentração de MCP-1 aumentou em células estimuladas com EnP (Figura 35 A), EP-PbA (Figura 35 B), extrato do parasita (Figura 35 C), VEGF (Figura 35 D), IFN-γ (Figura 35 E), TNF (Figura 35 F) e LPS (Figura 35 G) em relação às células NE. A liberação de MCP-1 foi maior principalmente em células estimuladas com extrato de PbA, sendo essa secreção tempo-dependente, atingindo uma concentração de 10.572,2 pg/ml em 24 horas. Também foi observado um aumento tempo-dependente de MCP-1 em células estimuladas com IFN-γ, chegando a um pico de concentração de 6.694,68 pg/ml em 24 horas.

Já em células estimuladas com TNF houve um pico na concentração de MCP-1 no estímulo por 6 horas (9.931,26 pg/ml), passando a decair após esse tempo, porém, ainda apresentaram concentrações elevadas em 12 e 24 horas de estímulo, em relação às células não estimuladas. O mesmo foi observado no estímulo por LPS, cuja maior concentração foi em 6 horas (8.417,59 pg/ml), decaindo após esse período.

Esses dados indicam que tanto fatores do parasita (EP-PbA, extrato), quanto IFN-γ, TNF, VEGF e LPS, são capazes de aumentar a liberação MCP-1 por CEPP-DBA/2 e que a concentração MCP-1 é tempo-dependente com IFN-γ e com extrato do parasita (Figura 35).

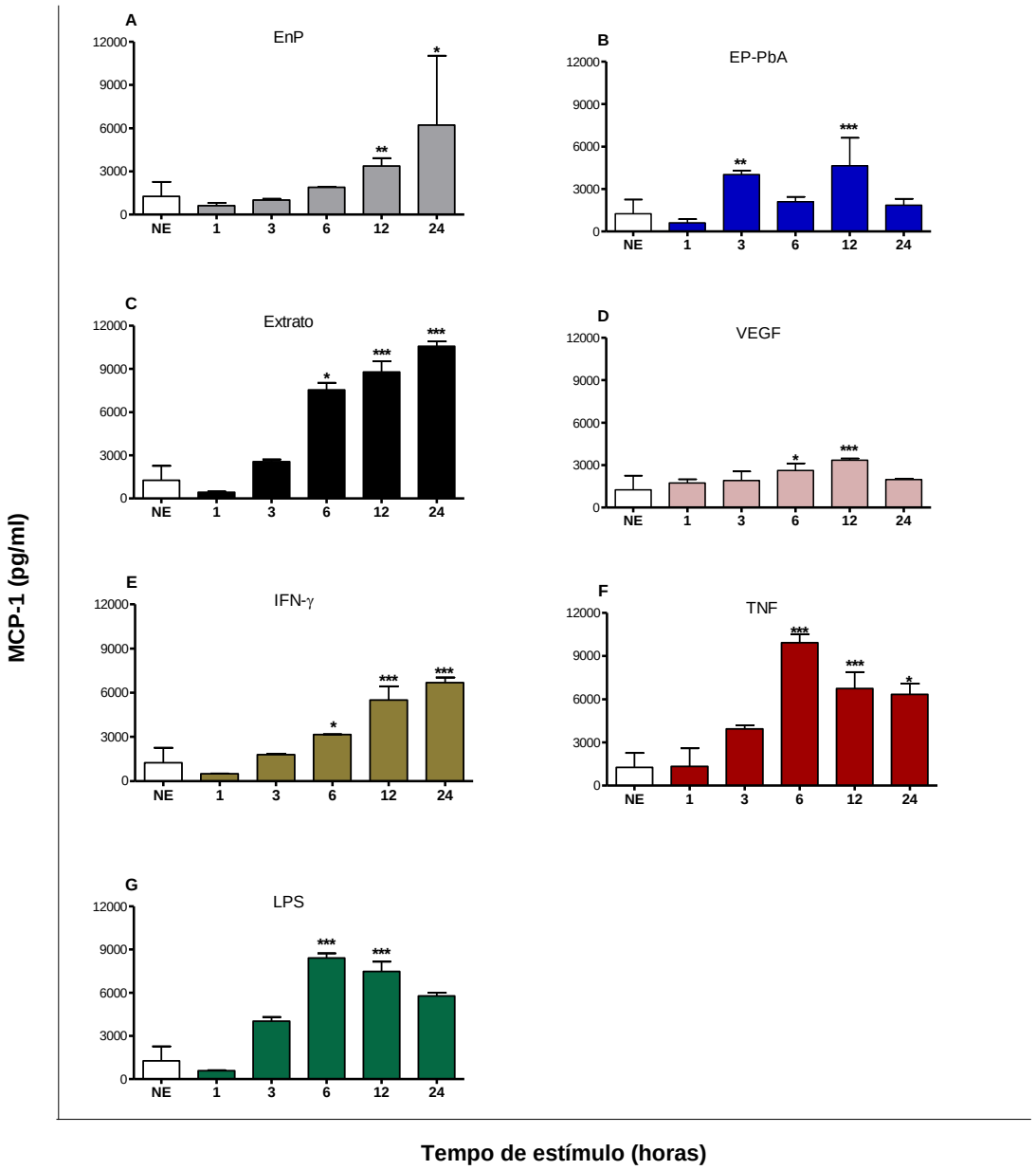

Figura 35 - A produção de MCP-1 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 aumenta após estímulo com extrato do parasita, EP-PbA, EnP, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS.
Concentração de MCP-1 em CEPP-DBA/2 frente a estímulo por EnP (A), EP-PbA (B), Extrato (C), VEGF (D), IFN-γ (E), TNF (F), LPS (G). A quantificação foi realizada pelo método de CBA (BD). Dados referente a um experimento (n= 3 por estímulo; dados apresentados em duplicata). NE: corresponde a média das células não estimuladas em todos os tempos. (Teste Kruskal-wallis, seguido do pós-teste de comparação multipla de Dunns, onde * p<0,05; ** p< 0,01 e *** p<0,001 em relação às células NE). CEPP-DBA/2: células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2; EnP: eritrócito não parasitado; EP-PbA: eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA.

Nós observamos que a concentração de RANTES aumentou em células estimuladas com EnP (Figura 36 A), EP-PbA (Figura 36 B), extrato do parasita (Figura 36 C), VEGF (Figura 36 D), IFN-γ (Figura 36 F), TNF (Figura 36 G) e LPS

(Figura 36 H) em relação às células NE, apesar de que em células estimuladas com EP-PbA, VEGF e IFN-γ este aumento foi muito tênue (Figura 36).

Por outro lado, as células estimuladas com EnP, Extrato de PbA, TNF e LPS, houve um aumento mais evidente tempo-dependente, sendo que nos estímulos por Extrato e TNF o pico foi observado em 24 horas (16,92 e 116,93 pg/ml, respectivamente), enquanto em células estimuladas com LPS o pico de concentração foi observado em 12 horas (592,31 pg/ml), diminuindo em 24 horas.

Esses resultados indicam que, tanto fatores do parasita (extrato), quanto TNF e LPS, são capazes de aumentar a liberação RANTES em CEPP-DBA/2. (Figura 36).

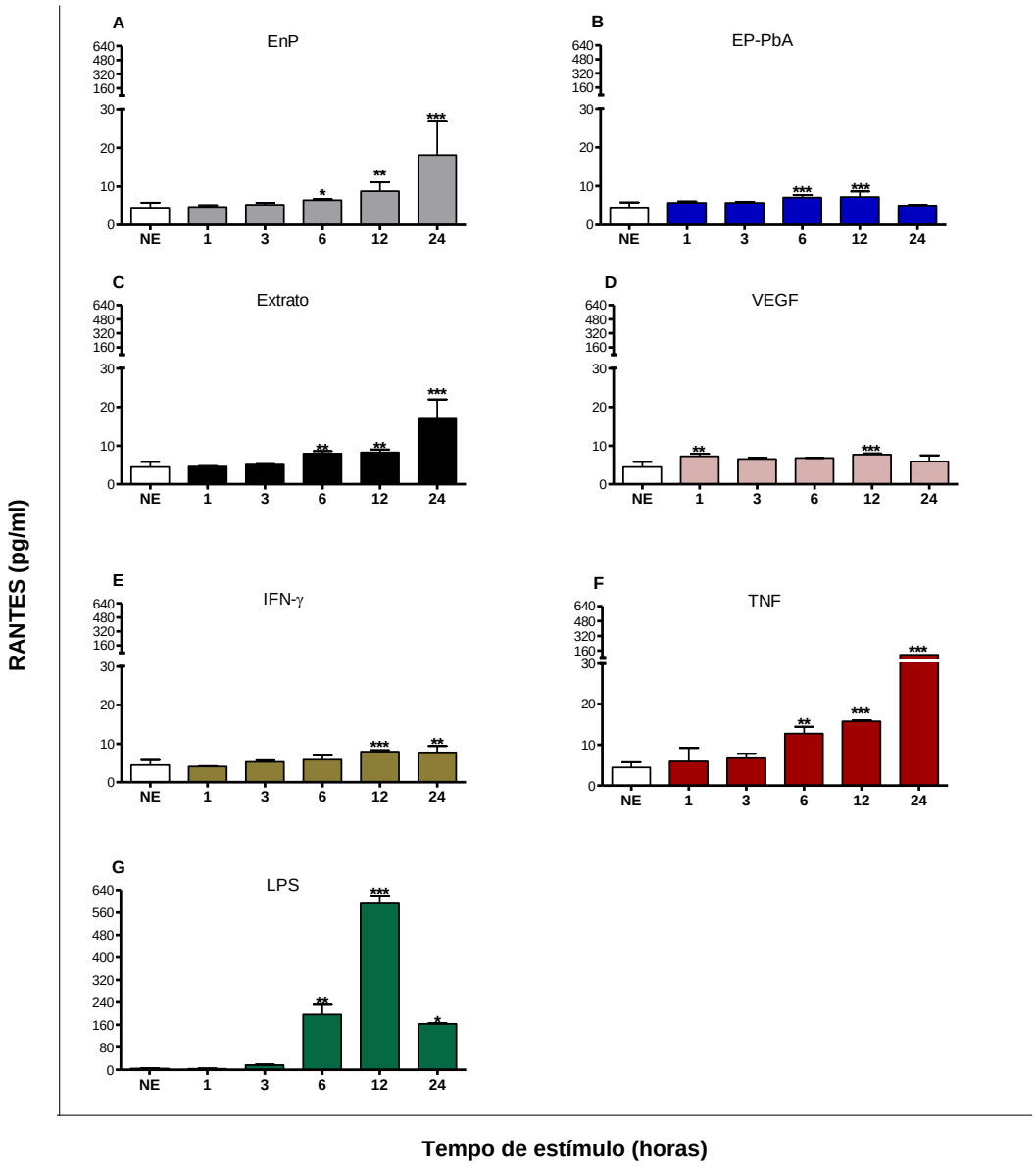

Figura 36 - A produção RANTES em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 aumenta após estímulo com extrato do parasita, EP-PbA, EnP, VEGF, IFN-γ, TNF e LPS.

Concentração de RANTES em CEPP-DBA/2 frente a estímulo por EnP (A), EP-PbA (B), Extrato (C), VEGF (D), IFN-γ (E), TNF (F), LPS (G). A quantificação foi realizada pelo método de CBA (BD). Dados referente a um experimento (n= 3 por estímulo; dados apresentados em duplicata). NE: corresponde a média das células não estimuladas em todos os tempos. (Teste Kruskal-wallis, seguido do pós-teste de comparação multipla de Dunns, onde * p<0,05; ** p< 0,01 e *** p<0,001 em relação às céluulas NE). CEPP-DBA/2: células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2; EnP: eritrócito não parasitado; EP-PbA: eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA.

5.3 Estudo da citoadesão de eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

Fatores inflamatórios ativam células endoteliais e podem contribuir para a citoadesão de EP (CARVALHO et al., 2010; EL-ASSAAD et al., 2013). Por outro lado, estudos anteriores indicam que TNF (MAKNITIKUL et al., 2017), IFN-γ (SOUZA et al., 2013) e VEGF (EPIPHANIO et al., 2010) estão envolvidos na SDRA associada à malária. Para analisar a citoadesão no modelo de SDRA, ensaios de adesão estático e em fluxo foram realizados com CEPP-DBA/2 estimuladas e posteriormente colocadas em contato com eritrócitos parasitados (EP-PbA).

Nos ensaios de adesão estático foram utilizados os estímulos EnP, extrato de EP-PbA, VEGF, IFN-γ, TNF e VEGF, durante 1, 3, 6 12, 24, 48 e 72 horas e no ensaio de adesão em fluxo foram analisadas células estimuladas com TNF por 24 horas.

5.3.1 TNF, extrato do parasita, LPS e VEGF aumentam a citoadesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

Nos ensaios de adesão estático foi observado aumento na adesão de EP-PBA em células estimuladas com extrato do parasita em 3 e 12 horas de estímulo (Figura 37 B e D), em células estimuladas com TNF em 6, 24 e 72 horas de estímulo (Figura 37 C, E e F) . Em 6 horas de estímulo também foi observado um aumento da adesão em células estimuladas com VEGF (Figura 37 C).

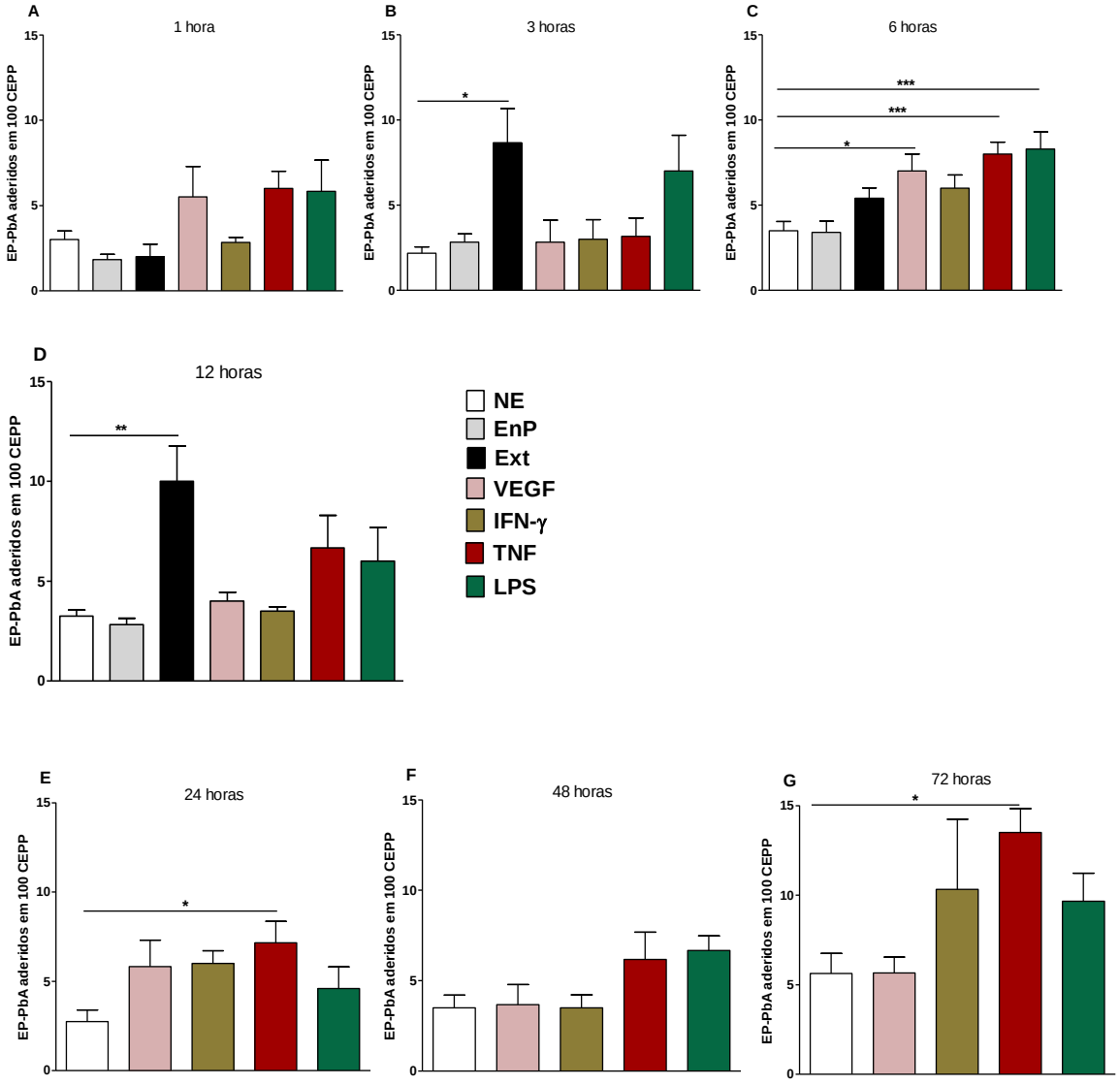

Figura 37 - Adesão de eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA é maior em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 estimuladas com VEGF, extrato, LPS e TNF.

Ensaio de adesão estático de EP em células não estimuladas ou com 1 hora (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E), 48 horas (F) e 72 horas de estímulo (G). Gráfico de 3 experimentos agrupados expressos com média ± SEM (Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's, onde *p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001). NE: células não estimuladas; EnP: eritrócitos não parasitados; EP-PbA: eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA; Ext: extrato de *Plasmodium berghei* ANKA.

5.3.2 TNF aumenta a adesão de eritrócitos parasitados com P. berghei ANKA em fluxo

Com o objetivo de mimetizar a adesão de EP-PbA em células endoteliais em condições fisiológicas (fluxo sanguíneo), CEPP-DBA/2 dispostas em placas de cultura em Labteck chamber slide (permanox) foram estimuladas com TNF por 24 horas. Após esse período o sobrenadante foi removido e adicionado EP-PbA aos poços por 1 hora, e posteriormente, as células foram submetidas ao fluxo. As imagens foram capturadas no tempo inicial e depois a cada 3 minutos (até 15 minutos) (Figura 38 A e B). A análise da sequência destas imagens demostrou que as células submetidas ao TNF têm maior quantidade de eritrócitos parasitados aderidos (relação entre EP-PbA aderidos tempo inicial menos tempo final) (Figura 38 C).

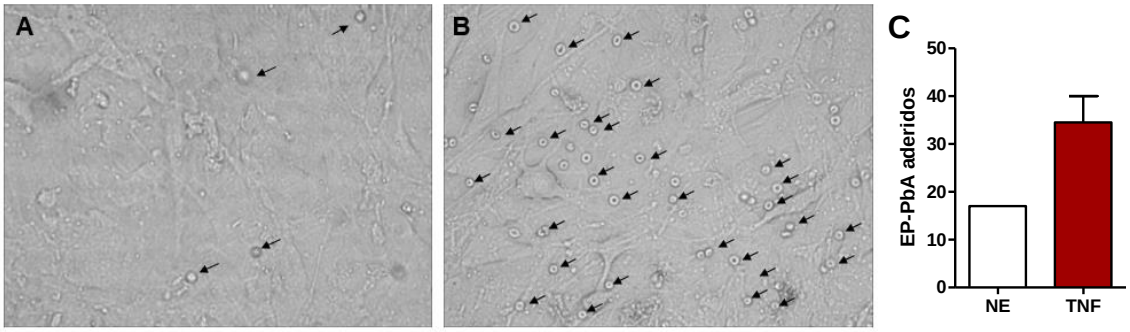

Figura 38 – TNF aumenta a adesão de eritrócitos parasitados com Plasmodium berghei ANKA em ensaio de adesão em fluxo
Imagens de células endoteliais pulmonares primárias sem estímulo (A) e estimuladas com TNF por 24 horas, após 3 minutos de fluxo (B). Quantificação do número de EP-PbA aderidos após 15 minutos de fluxo (C). Aumento de 400 vezes onde é possível observar os eritrócitos parasitados aderidos nas células endoteliais. NE: células não estimuladas; EP-PbA: eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA; Setas inicam EP-PbA aderidos às células endoteliais.

5.3.3 TNF e IFN-γ aumentam a expressão de ICAM-1, VCAM e EPCR em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

Uma vez que foi observada diferença na quantificação de moléculas de adesão por imunoistoquímica entre animais SDRA e HP, analisamos o envolvimento destas moléculas, como ICAM-1, CD36, VCAM e EPCR, em um sistema *ex-vivo* mais controlado, como nos ensaios de adesão de EP-PbA em CEPP-DBA/2.

Para a quantificação da expressão gênica destas moléculas de adesão, CEPP-DBA/2 primárias foram estimuladas com LPS, IFN-γ, TNF, VEGF, extrato do parasita (Ext) e EP-PbA e EnP e comparados com NE, em diferentes tempos de estímulo. Essas amostras foram submetidas à extração de RNA, cDNA e as reações de qRT-PCR. Os resultados obtidos foram normalizados com o gene constitutivo HPRT. O método quantitativo usado para as análises foi o $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Ao analisarmos a expressão gênica de ICAM-1 nos diferentes tempos, observamos um aumento da expressão dessa molécula em células estimuladas com TNF por 1, 6, 12, 48 e 72 horas em relação às células não estimuladas (NE) (Figura 39 A, C, D, F e G). Também houve aumento da expressão gênica de ICAM-1 em CEPP estimuladas com IFN-γ por 3, 12, 24 e 48 horas em relação às células NE (Figura 39 B, D, E e F). Por último, foi observado nas CEPP estimuladas com LPS um aumento na expressão gênica de ICAM-1 em relação as não estimuladas (Figura 39 A).

Como era esperado, nossos resultados indicaram que estímulos inflamatórios como TNF e IFN-γ aumentaram a expressão de ICAM-1 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2, em diferentes tempos de estímulo, sugerindo forte contribuição para a adesão dos EP-PbA durante a SDRA.

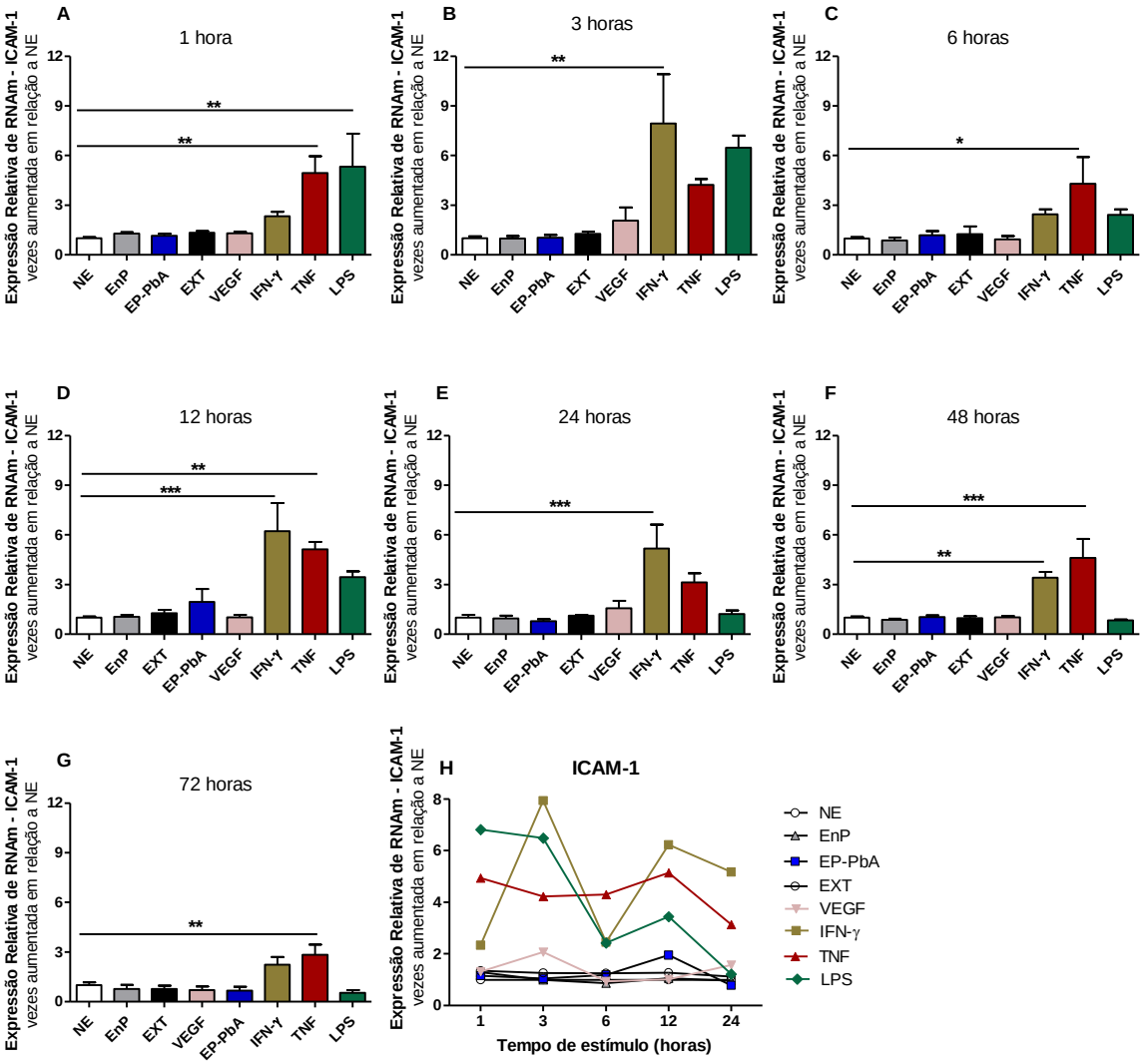

Figura 39 - Expressão gênica de ICAM-1 em culturas de células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.
Expressão gênica de ICAM-1 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 estimuladas com EP-PbA, Ext, VEGF, IFN-γ, TNF, LPS ou não estimuladas por 1 hora (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E), 48 horas (F) e 72 horas (G). Comparação de todos os tempos observados (H). Valores obtidos por PCR em tempo real, analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e expressos em número de vezes aumentado em relação às células NE. Dados de 2 experimentos agrupados (n=6 por estímulo e por tempo) expressos com média ± SEM (Teste One-way ANOVA, pós-teste Bonferroni onde *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). NE: células não estimuladas; EP-PbA: eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA; EnP: eritrócitos não parasitados; Ext: extrato de *P. berghei* ANKA.

Como esperado, foi observada também uma maior expressão gênica de VCAM em células estimuladas com LPS, por 1, 3, 6 e 24 horas em relação às não estimuladas (Figura 40 A, B, C e E). Houve também um aumento de VCAM em CEPP-DBA/2 estimuladas com TNF por 1 hora, 3 horas, 12 horas, 48 horas e 72 horas em relação às CEPP-DBA/2 NE (Figura 40 A, B, D, F e G).

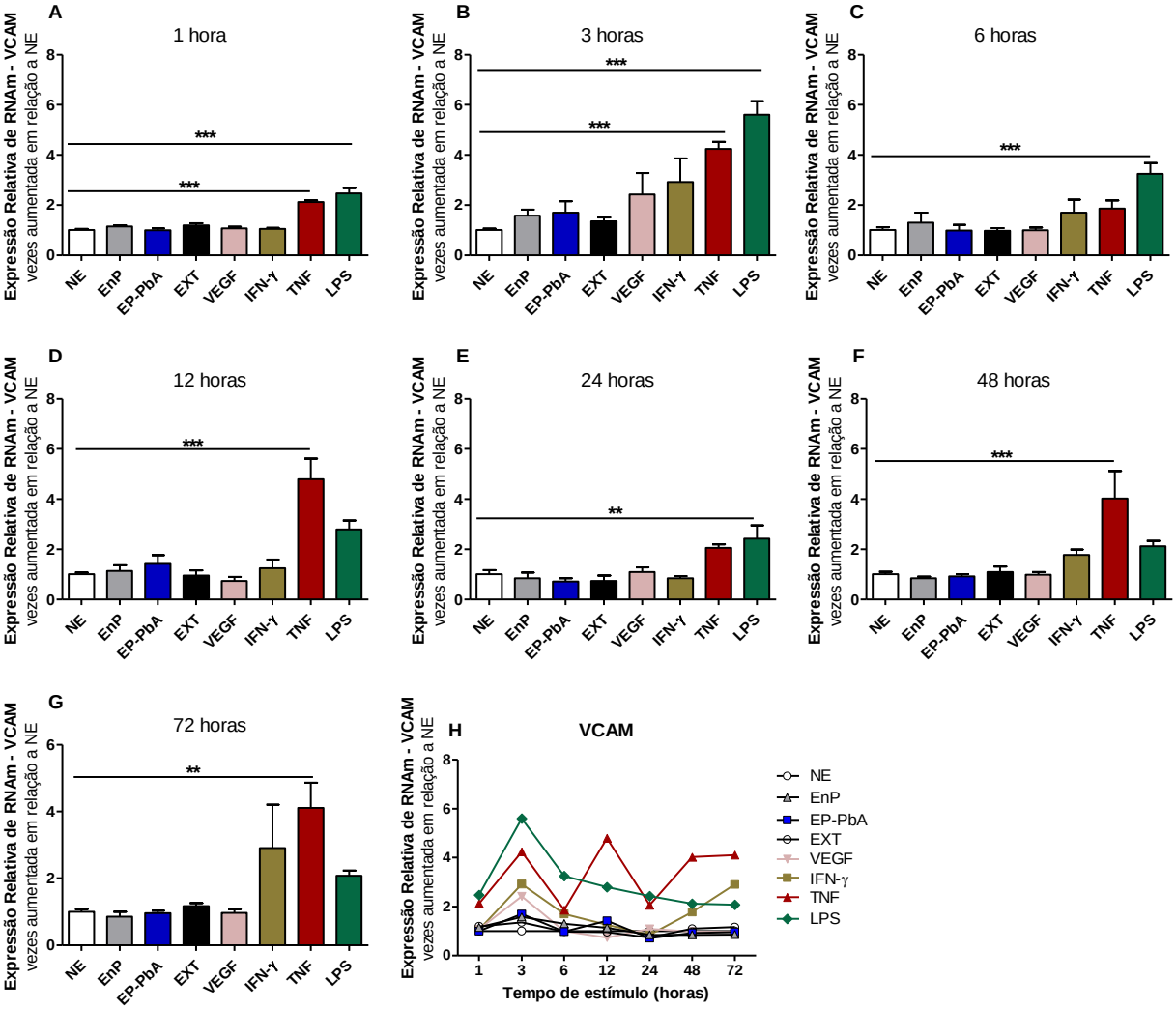

Figura 40 - Expressão gênica de VCAM em culturas de células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.
Expressão gênica de VCAM em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 estimuladas com EP-PbA, Ext, VEGF, IFN-ɣ, TNF, LPS ou não estimuladas por 1 hora (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E), 48 horas (F) e 72 horas (G). Comparação de todos os tempos observados (H). Valores obtidos por PCR em tempo real, analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e expressos em número de vezes aumentado em relação às células NE. Dados de 2 experimentos agrupados (n=6 por estímulo e por tempo) expressos com média ± SEM (Teste One-way ANOVA, pós-teste Bonferroni onde *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). NE: células não estimuladas; EP-PbA: eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA; EnP: eritrócitos não parasitados; Ext: extrato de *P. berghei* ANKA.

Em relação à expressão gênica de CD36, não foi observada diferença frente aos diferentes estímulos, o que não era esperado, nos diferentes tempos analisados em relação às células não estimuladas (Figura 41). Houve apenas uma diminuição na expressão gênica de CD36 com 12 horas de estímulo em relação às células não estimuladas (Figura 41 D).

Em geral, os valores de expressão gênica de CD36 foram muito baixo, aumentados no máximo duas vezes no tempo de 1 hora para EnP e nos demais tempos estão muito próximos do não estimulado. Dessa maneira acreditamos que essas diferenças na expressão gênica não reflitam a nenhuma diferença biologicamente relevante.

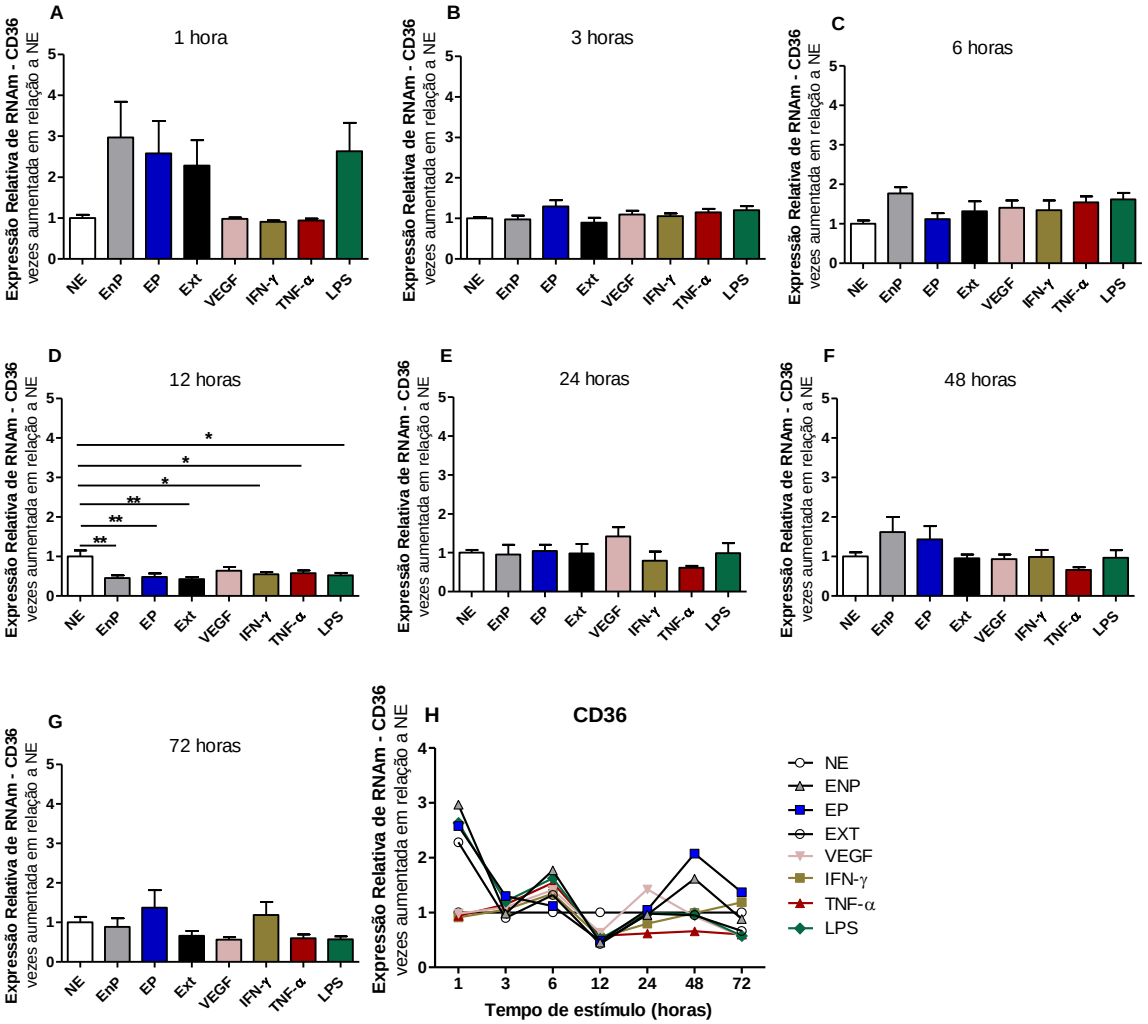

Figura 41 - Expressão gênica de CD36 em culturas de células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.
Expressão gênica de CD36 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 estimuladas com EP-PbA, Ext, VEGF, IFN-γ, TNF, LPS ou não estimuladas por 1 hora (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E), 48 horas (F) e 72 horas (G). Comparação de todos os tempos observados (H). Valores obtidos por PCR em tempo real, analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e expressos em número de vezes aumentado em relação às células NE. Dados de 2 experimentos agrupados (n=6 por estímulo e por tempo) expressos com média ± SEM (Teste One-way ANOVA, pós-teste Bonferroni onde *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). NE: células não estimuladas; EP-PbA: eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA; EnP: eritrócitos não parasitados; Ext: extrato de *P. berghei* ANKA.

Também foi observada uma maior expressão gênica de EPCR (*Endotelial Protein C Receptor*) em células estimuladas com LPS em 24 e 48 horas (Figura 42 A e B) e em células estimuladas com TNF em 48 e 72 horas (Figura 42 e C).

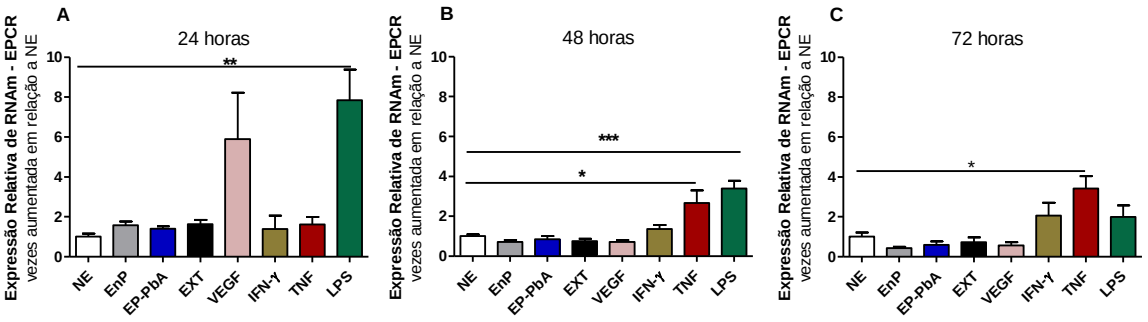

Figura 42 - Expressão gênica de EPCR em culturas de células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.
Expressão gênica de EPCR em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 estimuladas com EP-PbA, Ext, VEGF, IFN-ɣ, TNF, LPS ou não estimuladas durante 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). Valores obtidos por PCR em tempo real, analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e expressos em número de vezes aumentado em relação às células NE. Dados de 2 experimentos agrupados (n=6 por estímulo e por tempo) expressos com médiam ± SEM (Teste One-way ANOVA, pós-teste Bonferroni onde *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). NE: células não estimuladas; EP-PbA: eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA; EnP: eritrócitos não parasitados; Ext: extrato de *P. berghei* ANKA; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; TNF: fator de necrose tumoral, LPS: lipopolissacarídeo.

A expressão de moléculas de adesão também foi avaliada por citometria de fluxo em CEPP. Inicialmente marcamos as células vivas (que não marcavam com 7-AAD). Partindo das células vivas, observamos a frequência de ICAM-1, VCAM e CD36 em células frente a diferentes estímulos por 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Porém, não houve diferença na expressão de ICAM-1, VCAM e CD36 frente aos diferentes estímulos quando comparado às células não estimuladas (NE) (dados não demonstrados). Não sabemos ao certo se houve algum artefato de técnica, mas o fato é que observamos que as células não estimuladas apresentaram alta expressão de ICAM-1, VCAM e CD36 nos diferentes tempos, o que não era suposto, conforme demostrado na figura 43. Uma hipótese é de que as técnicas empregadas para soltar as células das placas (com *cell scraper* ou tripsina) e a manipulação das mesmas foi o suficiente para ativá-las e induzí-las a expressar moléculas de adesão (Figura 43).

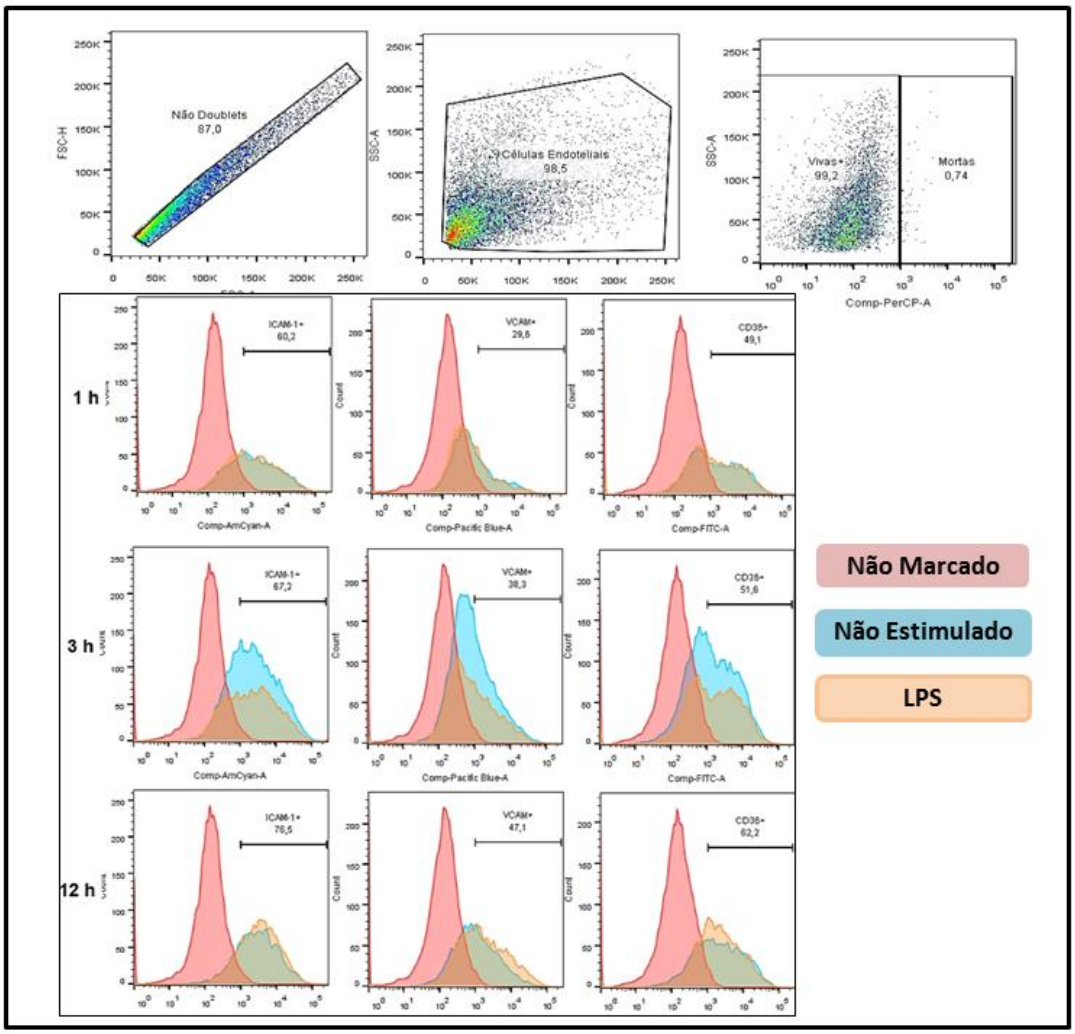

Figura 43 - Estratégia da análise das moléculas de adesão em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 por citometria de fluxo.
Primeiramente foram retirados os *"doublets"*, então foram selecionadas as células endoteliais vivas (não marcadas com 7AAD) e, posteriormente, analisadas a intensidade de fluorescência por histogramas.

5.3.4 Células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2 estimuladas com eritrócitos parasitados de Plasmodium berghei ANKA produzem TNF

Sabendo que o TNF é importante para a citoadesão, como observado nos resultados anteriores (ensaios de adesão estático e em fluxo, aumento da expressão de moléculas de adesão), decidimos verificar se as CEPP-DBA/2 possuem a capacidade de produzir TNF frente ao estímulo de EP-PbA. Surpreendentemente, observamos que estas células, quando estimuladas com formas maduras EP-PbA durante 24 horas, produziram grande quantidade de TNF (cerca de 600 vezes) em comparação às células não estimuladas (NE) (Figura 44). Esse resultado é interessante, pois indica que os eritrócitos parasitados também contribuem para a

produção de TNF, favorecendo o microambiente pulmonar a aumentar expressão de ICAM-1, VCAM e EPCR, e consequentemente, colaborando a citoadesão do EP-PbA.

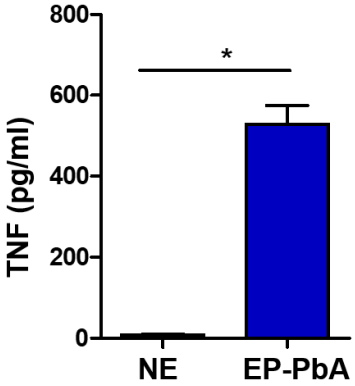

Figura 44 - Células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 produzem TNF quando estimuladas com eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA.
A quantificação foi realizada pela técnica de Elisa. Resultados de 2 experimentos independentes (n=4 por grupo) expressos com média ± SEM (Teste Mann Whitney, onde *p<0,05). NE: não estimulado; EP-PbA: eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA.

5.3.5 Macrófagos e neutrófilos estimulados com eritrócitos parasitados de Plasmodium berghei ANKA promovem a adesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

Uma vez que macrófagos produzem uma grande quantidade de fatores inflamatórios, incluindo o TNF, nos perguntamos se EP-PbA, por si só, poderiam induzir a produção de TNF em macrófagos e se esta poderia interferir na adesão de eritrócitos parasitados às células endoteliais.

Com esse objetivo, foram desenhados ensaios com transwell onde foi avaliada a capacidade de EP-PbA aderir em CEPP na presença de macrófagos peritoneais (MΦ) ou neutrófilos extraídos da medula óssea (PMN), previamente tratados com EP-PbA, EnP ou não tratados.

Nossos resultados indicaram que as células que entram em contato com MΦ estimulados com EP-PbA demonstraram maior capacidade de adesão em relação às células endoteliais que entraram em contato com sobrenadante de MΦ estimulados com EnP, MΦ sem estímulo ou com CEPP que não entraram em contato com MΦ (Figura 45 A e B).

Além disso, após a análise dos sobrenadantes coletados nos ensaios de transwell com MΦ e CEPP, verificamos que os MΦ produziram mais TNF. Esta produção não foi igualmente observada em MΦ não estimulados ou estimulados

com EnP (Figura 45 C). Também foi estudada a liberação de IL-6 e IL-10, entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos analisados (Figura 45 D e E).

Esses resultados em conjunto indicam que EP-PbA foram capazes de induzir a produção de TNF pelos MΦ, o que poderia auxiliar a expressão de moléculas de adesão e consequentemente a adesão de EP-PbA em CEPP-DBA/2 no microambiente pulmonar.

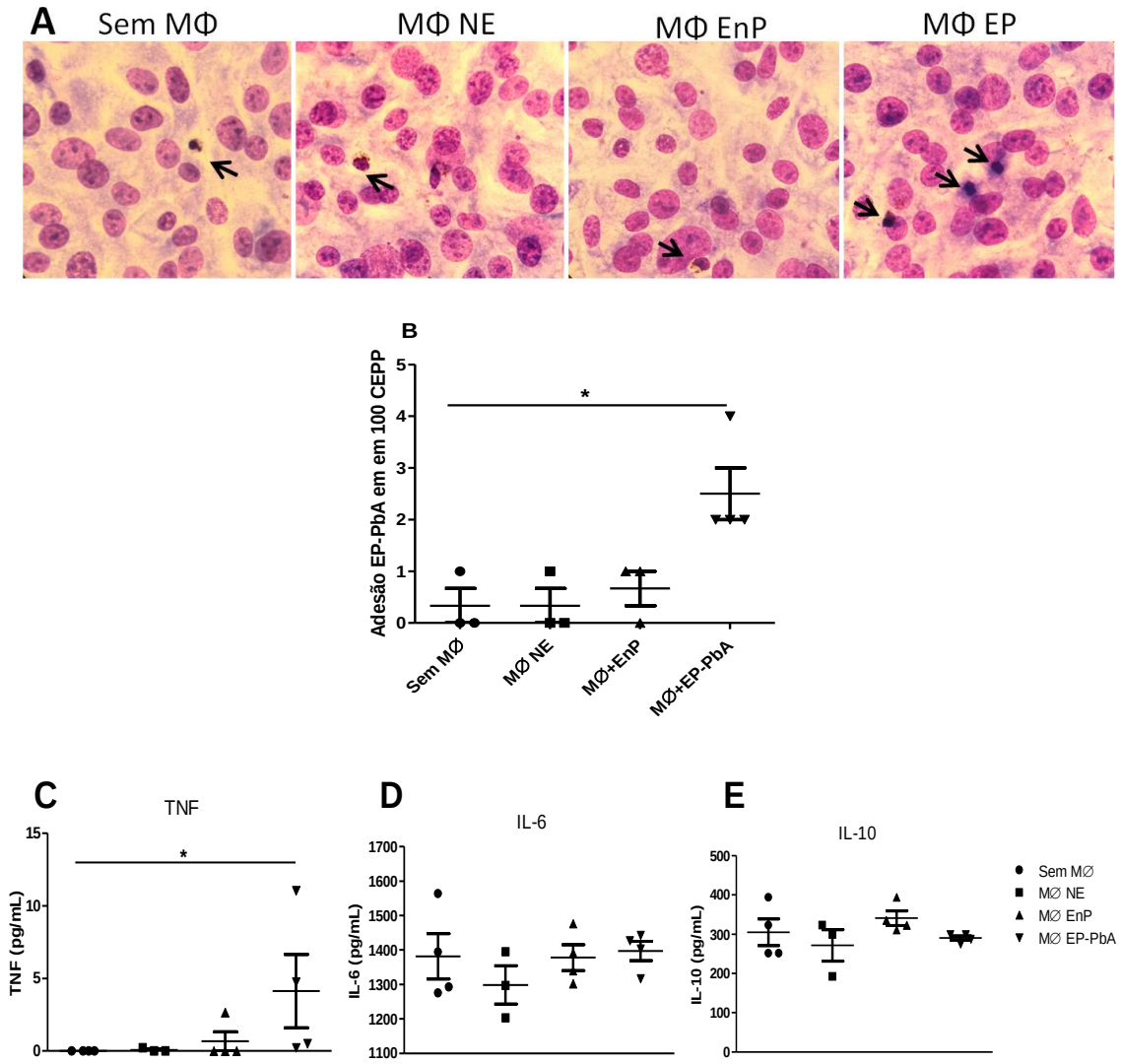

Figura 45 - Eritrócitos parasitados de *Plasmodium berghei* ANKA em contato com macrófagos promovem a citoadesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.
Imagens representativas de ensaio de adesão de células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2 (CEPP) que entraram em contato com macrófagos peritoneais estimulados durante 24 horas com eritrócitos parasitados, MΦ estimulados com eritrócitos não parasitados, MΦ sem estímulo ou CEPP que não entraram em contato com MΦ (A). Contagem de eritrócitos parasitados em 100 CEPP-DBA/2 (B). Concentração de TNF (C), IL-6 (D) e IL-10 (E) no sobrenadante das CEPP-DBA/2 analisado por ELISA. Resultado representativo de 2 experimentos; n= 3 a 4 lamínulas por estímulo, expressos com média ± SEM (Teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, *p<0,05). Setas indicam eritrócitos parasitados em contato com as células endoteliais. MΦ: macrófagos peritoneais; NE: não estimulado; EnP: eritrócito não parasitado; EP-PbA: Eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA.

Nos ensaios de transwell com neutrófilos (PMN) extraídos da medula óssea de camundongos DBA/2, foi observado que as células que entram em contato com sobrenadante de PMN estimulados com EP-PbA possuem uma maior capacidade de adesão em relação às células endoteliais expostas ao sobrenadante de PMN estimulados com EnP (Figura 46). Também foi mensurada a produção de citocinas inflamatórias (TNF, IL-6 e IL-10) nos sobrenadantes das CEPP em contato com PMN, entretanto essas citocinas não foram detectadas (dados não mostrados).

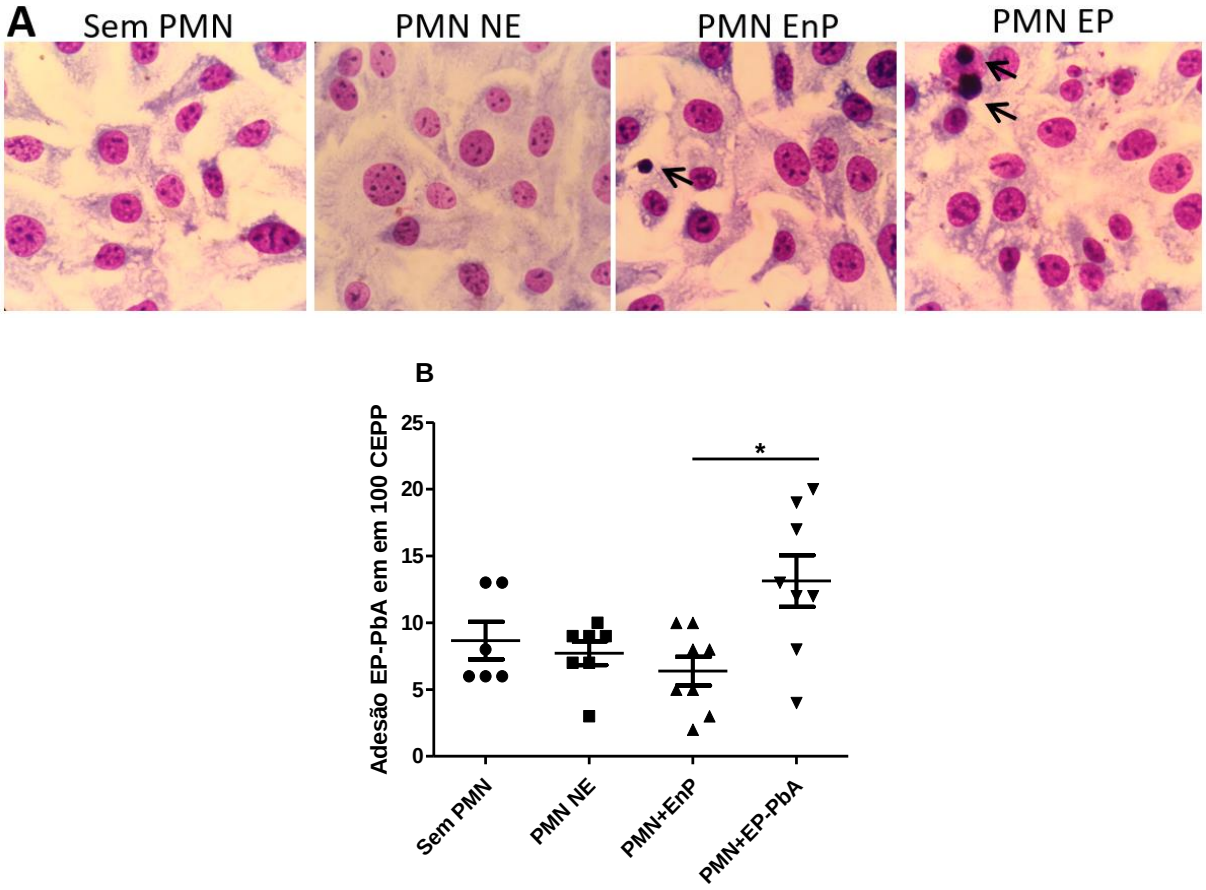

Figura 46 - Eritrócitos parasitados de *Plasmodium berghei* ANKA em contato com neutrófilos promovem a citoadesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.
Imagens representativas de ensaio de adesão de células endoteliais que entraram em contato com neutrófilos da medula óssea estimulados durante 24 horas com eritrócitos parasitados de *P. berghei* ANKA, com eritrócitos não parasitados, PMN sem estímulo ou CEPP que não entraram em contato com PMN (A). Contagem de eritrócitos parasitados em 100 CEPP-DBA/2 (B). Resultado representativo de 2 experimentos; n= 3 a 4 lamínulas por estímulo, expressos com média ± SEM (Teste Kruskal Wallis e pós-teste de Dunns, *p<0,05). Setas indicam eritrócitos parasitados em contato com as células endoteliais. PMN: neutrófilos extraidos da medua óssea; NE: não estimulado; EnP: eritrócito não parasitado; EP-PbA: Eritrócito parasitado com *Plasmodium berghei* ANKA.

5.3.6 Tratamento com anticorpo neutralizante de TNF diminui a adesão de eritrócitos parasitados

Conforme já descrito nos nossos resultados anteriores, foi observado que o estímulo com TNF em CEPP aumenta a expressão de moléculas de adesão, bem como a adesão de EP-PbA. Consequentemente, perguntamo-nos se a neutralização de TNF poderia diminuir a adesão EP. Dessa maneira, as CEPP foram estimuladas com TNF, anticorpo IgG e/ou com anticorpo neutralizante de TNF por 24 horas e, após esse período, foi realizado o ensaio de adesão com formas maduras de EP-PbA.

Como observado anteriormente, houve um aumento da adesão de EP-PbA em CEPP-DBA/2 estimuladas com TNF em relação às células não estimuladas (NE). Entretanto, anticorpos neutralizante de TNF (Anti-TNF) diminuíram a adesão (Figura 47).

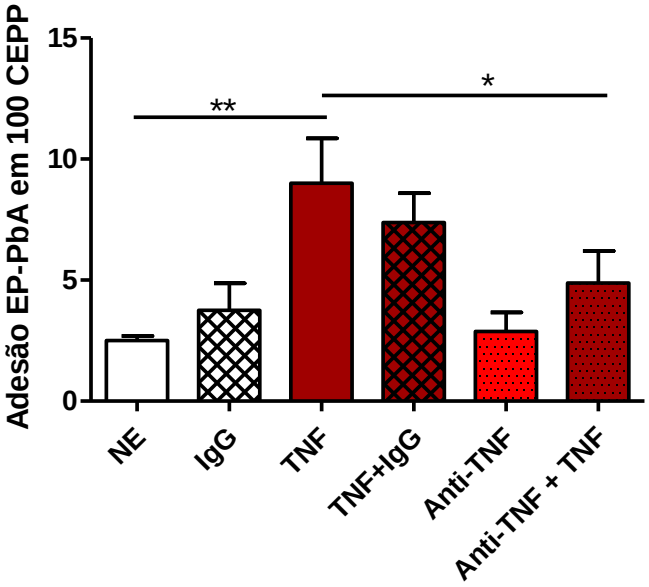

Figura 47 - A neutralização de TNF diminui a adesão de EP-PbA em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.
Ensaio de adesão estático de eritrócitos parasitados (por 1 hora) em células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2 não estimuladas (NE) ou estimuladas com IgG, TNF e anticorpo neutralizante de TNF (Anti-TNF) durante 24 horas. Figura representativo de 2 experimentos agrupados, expressos com média ± SEM (n=8 por grupo) (Teste One-way ANOVA, pós teste Bonferroni, onde *p<0,05; ** p<0,01). EP-PbA: Eritrócito parasitado de *Plasmodium* berghei ANKA.

5.3.7 A dexametasona protege a permeabilidade de células endoteliais pulmonares frente aos eritrócitos parasitados de Plasmodium berghei ANKA.

Uma vez que observamos que a dexametasona diminui a permeabilidade vascular pulmonar em animais infectados e tratados, nos questionamos quais os mecanismos que poderiam estar envolvido na proteção da barreira álveolo-capilar. Inicialmente, para endereçar esta questão, realizamos um ensaio de permeabilidade em células endoteliais pulmonares (CEPP) dispostas em placas de cultura em transwell e estimuladas com eritrócitos parasitados, seguido do ensaio de azul de Evans. Primeiramente, observamos não houve diferença em CEPP-DBA/2 estimuladas com eritrócitos não parasitados (EnP) em relação às CEPP-DBA/2 estimuladas com EnP e tratadas com dexametasona (EnP+Dexa) (Figura 48 A). Porém, nas células estimuladas com EP-PbA e tratadas com dexametasona houve menor passagem do corante azul de Evans em relação às CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA e não tratadas (Figura 48 B).

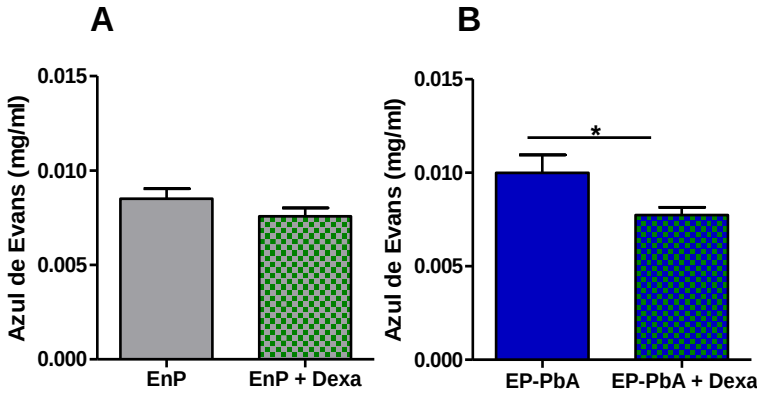

Figura 48 – Dexametasona diminui a permeabilidade nas células endotelais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 estimulados com eritrócitos parasitados de *Plasmodium berghei* ANKA.
CEPP tratadas ou não tratadas com dexametasona por 24 horas e estimuladas com eritrócitos não parasitados (A) ou com eritrócitos parasitados (B) por uma hora, seguido do ensaio de permeabilidade vascular com azul de Evans. Resultado de três experimentos agrupados (N=12 por grupo) expressos com média ± SEM (Teste Mann Whitney) (*p>0,5). EnP: eritrócitos não parasitados; EP-PbA: eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA; Dexa: dexametasona.

Em sequência, para responder esta questão, fomos observar os espaços interendoteliais através do arranjo dos filamentos de actina (marcados com *Phalloidina*), em CEPP-DBA/2 NE ou estimuladas com EnP ou ainda com EP-PbA.

Observamos que o estímulo com EP-PbA promoveu a abertura das junções interendoteliais e esse aumento foi significativo quando comparado às CEPP não

estimuladas ou estimuladas com EnP. O mais interessante é que o tratamento com dexametasona reduziu 4,37 vezes a abertura das junções interendoteliais em células estimuladas com EP-PbA em relação às células estimuladas com EP-PbA sem o tratamento (Figura 49).

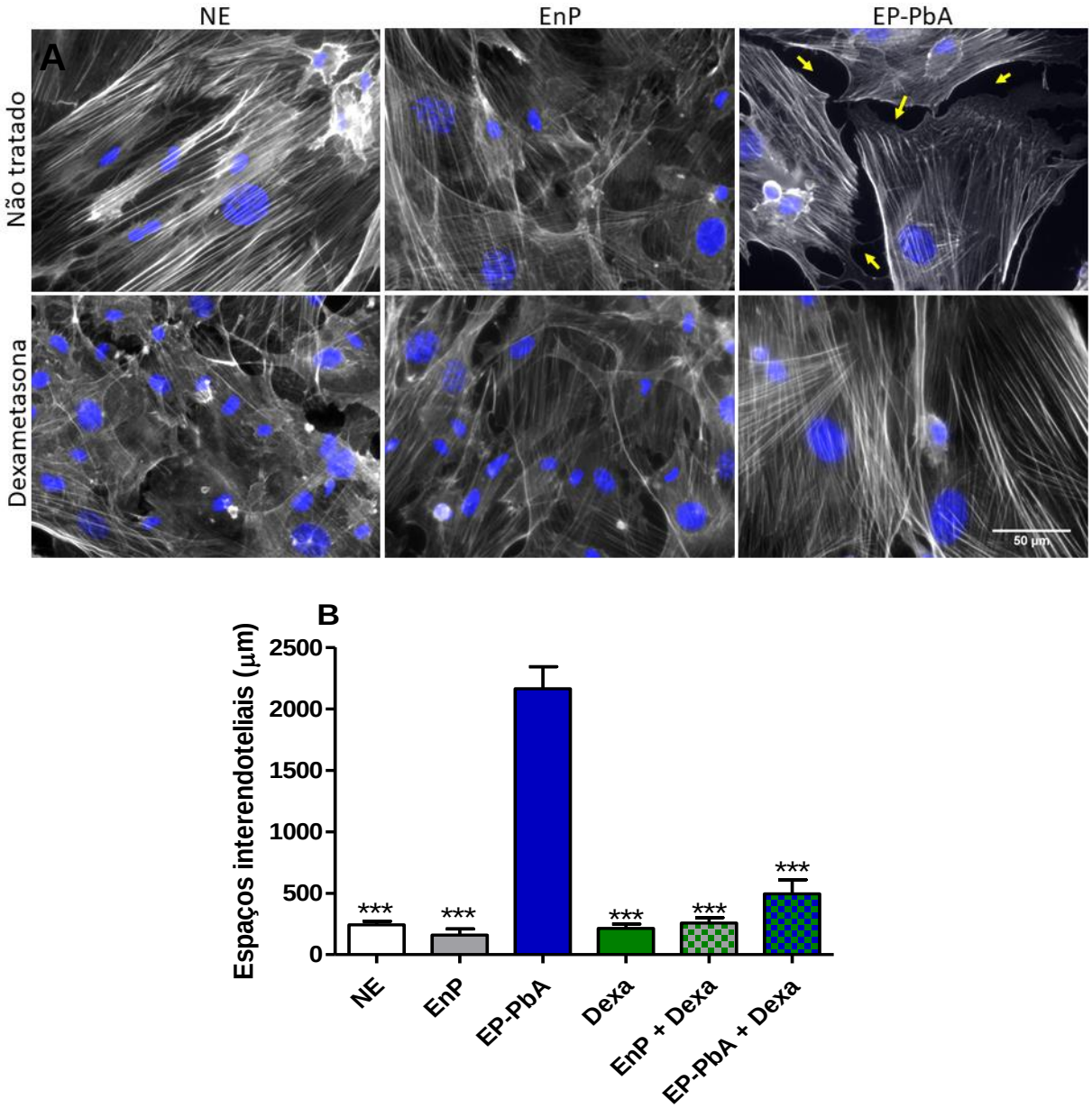

Figura 49 – A dexametasona diminui a abertura de junções interendoteliais promovida pelos eritrócitos parasitados de *Plasmodium berghei* ANKA.
Imagens representativas do citoesqueleto de CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA ou EnP, tratadas ou não com dexametasona (A). Para a quantificação das áreas dos espaços intercelulares foi utilizada o software ImageJ e a ferramenta "wand (tracing)". As aberturas das junções estão indicadas pelas setas amarelas. A actina foi marcada com Texas Red *Phalloidina* [1:100] e o núcleo das células com Hoechst 33342 [1:1000]. Resultado de um experimento expresso pela média ± SEM (ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni) n=3 (15 imagens por estímulo) (***p>0,001 em relação a EP-PbA). CEPP-DBA/2: células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2; EP-PbA: Eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA; EnP: Eritrócito não parasitado, NE: células não estimuladas. Dexa: dexametasona.

6 DISCUSSÃO

A SDRA associada à malária é uma forma grave da doença e pouco compreendida. Alguns modelos animais têm sido utilizados para estudar a patogênese da malária grave (CLARK; MACKAY, 2005; HANUM; HAYANO; KOJIMA, 2003; HEARN et al., 2000), no entanto, há poucos modelos experimentais que mimetizam a SDRA associada à malária em humanos (EPIPHANIO et al., 2010; LOVEGROVE et al., 2006; ORTOLAN et al., 2014; VAN DEN STEEN et al., 2010).

O estudo que mostra os aspectos fisiopatológicos da SDRA no modelo experimental de DBA/2 infectado com *P. berghei* ANKA é bastante interessante, pois reproduz características similares às encontradas em SDRA em humanos tais como: opacidade pulmonar, hipóxia, infiltrado inflamatório, presença de edama, membrana hialina e aumento da permeabilidade vascular (MAYBAUER; MAYBAUER; HERNDON, 2006; ORTOLAN et al., 2014). Além disso, neste modelo experimental (com *Plasmodium berghei* ANKA e DBA/2), os animais não desenvolvem malária cerebral (EPIPHANIO et al., 2010), o que possibilita estudos mais direcionados para SDRA, quando comparado com outros modelos murinos que utilizam *P. berghei* ANKA (DE SOUZA; RILEY, 2002; LOVEGROVE et al., 2008). Outro modelo murino também interessante de SDRA associada à malária é a associação de camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados com *Plasmodium berghei* NK65 (VAN DEN STEEN et al., 2010), pois o mesmo permitiria estudos mais específicos valendo-se de animais *knockouts.* Entretanto, apesar de este modelo ser instigante e bem delineado, pois utiliza um parasita que não desenvolve MC em camundongos C57Bl/6, após algumas tentativas, não conseguimos reproduzir os mesmos resultados descritos pelos autores.

Alguns estudos demostraram, *in vitro,* a adesão de eritrócitos parasitados de *P. falciparum, P. vivax* e *P. berghei* em células endoteliais (DE LAS SALAS et al., 2013; EL-ASSAAD et al., 2013; MUANZA et al., 1996; TRAORÉ et al., 2000). Entretanto, poucos estudos demostram a adesão de EP *in vivo* e os mecanismos de adesão não estão bem esclarecidos (ANSTEY et al., 2007; BEESON; BROWN, 2002; FRANKE-FAYARD et al., 2010; SARKAR; SAHA; DAS, 2010). Nossos achados prévios evidenciaram que EP-PbA aderem mais em pulmões de

camundongos que desenvolvem SDRA do que em camundongos HP (ORTOLAN, 2013).

Neste trabalho verificamos, por meio de bioluminescência *in vivo,* que camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA expressando Luciferase apresentaram estes eritrócitos acumulados ou aderidos nos pulmões, sugerindo fortemente que carga parasitária pulmonar é essencial para o desenvolvimento SDRA. Sabe-se que as formas maduras de EP de *P. falciparum* aderem à microvasculatura de diversos órgãos, o que é um aspecto importante na patogênese da malária grave em humanos (PINO et al., 2003; POUVELLE et al., 2000). Recentemente, foi demonstrado *in vitro* que EP de *P. berghei ANKA* (EP-PbA) são capazes aderir as células endoteliais microvasculares de pulmão de camundongos CBA/Ca (MVECS) e que TNF estimula a expressão de ICAM-1 e VCAM destas células (EL-ASSAAD et al., 2013).

Nós observamos que os animais classificados como SDRA, no 7º dia pós-infecção, apresentam maior área marcada de ICAM-1 nos pulmões quando comparado aos pulmões de animais HP. Além disso, há maior área de marcação de VCAM e CD36 em animais SDRA em relação a animais não infectado, indicando que há um aumento da expressão dessas moléculas de adesão frente à infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. Estudos anteriores indicam que o ICAM-1, proteína induzível expressa na superfície de células endoteliais, tem a sua expressão muito baixa ou não é expressa em condições fisiológicas (BHATIA; MOOCHHALA, 2004). Porém, durante a inflamação, IL-1 e TNF levam a um aumento de moléculas de adesão, como E-selectina e ICAM-1, aumentando a adesão de polimorfonucleares (PMN) e facilitando a transmigração para o interstício e vias aéreas distais do pulmão. Além disso, o ICAM-1 está envolvido na adesão de macrófagos alveolares nas células epiteliais, resultando em uma produção intensificada de citocinas e quimiocinas (WARD, 2003). Ainda, o papel do ICAM-1 tem sido demonstrado, especialmente com a utilização de anticorpos neutralizantes ou a deleção deste gene, observado em diversas condições, como pancreatite aguda, injúria respiratória induzida pela aspiração de partículas de diesel, injúria pulmonar induzida por bleomicina e traumas (BHATIA; MOOCHHALA, 2004).

O balanço entre respostas pró e anti-inflamatória é fundamental para a eliminação do parasita sem induzir lesão tissular (FREITAS DO ROSARIO; LANGHORNE, 2012). Estudos prévios demonstraram que a infecção malárica induz

tanto o aumento da produção de fatores pró-inflamatórias (TNF, IFN-γ, IL-6, entre outros), (ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002; DEROOST et al., 2013; KOBAYASHI et al., 2000) quanto anti-inflamatórios (IL-10, HO-1) (NIIKURA; INOUE; KOBAYASHI, 2011; WALTHER et al., 2012). Ainda, nós mostramos anteriormente esta dualidade na resposta inflamatória em modelo murino de SRDA associado à malária (ORTOLAN, 2013; PEREIRA et al., 2016; SERCUNDES et al., 2016). Nossos trabalhos anteriores indicaram que animais que desenvolveram SDRA apresentaram aumento da HO-1, uma potente enzima induzível com ação anti-inflamatória, tanto sérica quanto pulmonar, em relação aos camundongos não infectados ou que desenvolveram HP. Por outo lado, células e animais tratadas com hemina (um indutor de heme oxigenase) apresentaram menor inflamação e proteção da SDRA associado à malária (PEREIRA et al., 2016).

Dessa maneira, para estudar diferentes componentes do processo inflamatório na patogênese da SDRA, utilizamos o um anti-inflamatório esteroidal denominado dexametasona. Trata-se de um glicocorticoide da classe de hormônios esteroides que se liga a receptores intracelulares de glicocorticoides (GR) e, quando ocorre a ligação o complexo glicocorticoide/GR, este migra para o núcleo, onde inibe os fatores de transcrição como NF-KB e AP-1 (BARNES, 2006). Além disso, podem suprimir a ativação e o recrutamento de granulócitos, preservar a integridade das células endoteliais e controlar a permeabilidade vascular (THOMPSON, 2003).

Nós verificamos que animais tratados com dexametasona aumentaram a sobrevida e melhoraram os parâmetros respiratórios e os achados histopatológicos. Alguns dos nossos resultados (presença de edema e infiltrado inflamatório) corroboram com o modelo experimental de camundongos C57bl/6 infectados com *Plasmodium berghei* NK65 e tratados com a mesma dose de dexametasona (VAN DEN STEEN et al., 2010). Assim como nos nossos resultados, neste trabalho verificaram que a dexametasona levou a um aumento na parasitemia periférica e proteção da SDRA. A dexametasona também é conhecida por inibir o influxo de neutrófilos para os pulmões em ratos com SDRA (O'LEARY; EVANS; ZUCKERMAN, 1997), e nós demonstramos que os neutrófilos são essenciais para a patogênese da SDRA associada à malária (SERCUNDES et al., 2016), o que também contribuiria para o não desenvolvimento da SDRA nos animais tratados com este medicamento. De maneira semelhante, foi observado efeito protetor da dexametasona em outros modelos de SDRA como em modelo induzido por LPS onde a dexametasona (10

mg/Kg) reduziu o número de neutrófilos, linfócitos TCD3 e TCD4, TNF e IL-6 (AL-HARBI et al., 2016). Entretanto, nossos resultados não demonstraram diminuição de neutrófilos e de monócitos, pelo menos observado pela expressão gênica de Ncf2 e CD68, respectivamente. Porém, a dexametasona contribui para a resolução da inflamação, uma vez que aumenta a capacidade fagocítica e elimina neutrófilos apoptóticos (MADERNA et al., 2005).

Em relação ao acúmulo de *Plasmodium berghei* ANKA nos pulmões, observou-se que o tratamento com dexametasona aumentou 6,8 vezes a expressão gênica do parasita em animais tratados em relação ao controle não tratado, no 7º dia após a infecção. Portanto, hipotetizamos que o aumento da expressão gênica *P. berghei* nos animais tratados, poderia estar relacionado com os parasitas já fagocitados, uma vez que esta droga aumenta a fagocitose. Além disso, observamos uma grande quantidade de hemozoína no interior de células inflamatórias nos animais tratados, o que corrobora com a nossa hipótese sobre o aumento dos níveis de fagocitose induzidos pelo tratamento. Desta forma, estes eritrócitos parasitados, não estando aderidos ao endotélio vascular, não incitam o desenvolvimento da síndrome.

Uma outra hipótese, para explicar o aumento da expressão de PbA em animais tratados com dexametasona, é baseada em estudos que indicam que os glicocorticóides exibem um efeito vasodilatador (BOBADILLA et al., 1999; MAGGIORINI, 2010; MAIRBÄURL; BALOGLU, 2015). A dexametasona aumenta a expressão de eNOS e previne a vasoconstrição renal induzida por ciclosporina em ratos (BOBADILLA et al., 1999), ainda, pode aumentar a disponibilidade de óxido nítrico na circulação pulmonar levando a diminuição do tônus vascular pulmonar. (MAGGIORINI, 2010; MAIRBÄURL; BALOGLU, 2015).

Dessa maneira, acreditamos que a maior expressão gênica de *Plasmodium berghei* ANKA em animais tratados com dexametasona deva-se a diminuição do tônus da vasculatura pulmonar, e isto dificultaria a perfusão realizada com PBS acarretanto assim em um acúmulo de eritrócitos parasitados nos pulmões.

Quanto ao aumento da permeabilidade vascular, nossos resultados reafirmaram a sua importância na SDRA (ORTOLAN et al., 2014). Em um modelo murino de lesão pulmonar aguda por ventilação mecânica, o tratamento com dexametasona (20 µg por camundongo) reduziu os níveis de VEGF em homogenato de pulmão e inibiu a resposta inflamatória (KC, MIP-2, MCP-1, IL-1β, IL-6 e

neutrófilos), entretanto, diferente dos nossos achados, nesse modelo não foi observado melhora na permeabilidade vascular pulmonar (HEGEMAN et al., 2013). Nós observamos que o VEGF é produzido pelas células endoteliais pulmonares, apesar do baço ser a principal fonte de VEGF (EPIPHANIO et al., 2010). Este fator de crescimento é crucial no aumento da permeabilidade vascular e desenvolvimento da SDRA no nosso modelo experimental (EPIPHANIO et al., 2010), uma vez que o VEGF tem um efeito sobre a permeabilidade vascular 50.000 vezes maior que a histamina (ZEBROWSKI et al., 1999).

A hipóxia induz a produção de VEGF, o extravasamento vascular e formação de edema. Sabe-se que a inibição da atividade do VEGF por um anticorpo neutralizante pode bloquear o aumento da permeabilidade vascular induzida por hipóxia (SCHOCH; FISCHER; MARTI, 2002). As adaptações celulares à hipóxia dependem do fator de transcrição HIF, que se encontra inativo em condições normais de oxigênio, mas que é ativado em situações de hipóxia (ELTZSCHIG; CARMELIET, 2011). HIF pode também ser ativado sob condições normais de oxigênio, o que permite o início de uma resposta inflamatória antes do tecido tornar-se hipoxêmico. (ELTZSCHIG; CARMELIET, 2011).

No nosso modelo experimental já foi demostrado que o VEGF tem papel fundamental na patogênese da SDRA, onde verificou-se que a principal fonte produtora de VEGF é o baço e animais esplenectomizados estão protegidos do desenvolvimento da síndrome (EPIPHANIO et al., 2010). Ainda, o VEGF é capaz de induzir as moléculas de adesão: ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina em células endoteliais (HUVEC) durante a inflamação (KIM et al., 2001).

Para estudar de maneira mais isolada os mecanismos da adesão eritrocitária e da inflamação em modelo de SDRA, utilizamos culturas primárias de células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2.

Inicialmente, para nos certificarmos se as células isoladas dos pulmões dos camundongos eram realmente células endoteliais, foram realizadas marcações com *Ulex europaeus agglutinin* I (UEA I). O *Ulex europaeus agglutinin* I (UEA I), uma lectina obtida do *Ulex europaeus*, é descrita por ter afinidade específica para células endoteliais humanas em tecidos normais e em tecidos tumorais de origem vascular (MIETTINEN et al., 1983). Para testar a especificidade do UEA I foram realizados ensaios com outros tipos celulares, como fibroblastos (cedida pelo laboratório da Profa. Dra. Sylvia Stuchi) e com linhagem de citotrofoblastos de camundongos

(HTR9). Estes ensaios mostraram marcações positivas (dados não mostrados), indicando que este composto não é altamente específico para células endoteliais. Para a verificação da pureza das nossas culturas, fizemos um painel de marcadores específicos para células endoteliais, valendo-se de anticoprpos próprios para a detecção de vWF, CD31, CD62e, ACE, eNOS e VE-caderina, confirmando assim a especificidade celular. No presente trabalho, nós observamos que as CEPP-DBA/2 produzem VEGF, independente do estímulo e, que essa produção é tempo-dependente. Sabendo que as células endoteliais primárias, frente aos estímulos utilizados, permanecem viáveis (análise do metabolismo mitocondrial e marcação por 7AAD) e ativas (liberando VEGF e fatores inflamatórios), utilizamos esse modelo *ex vivo* para avaliar como as células endoteliais poderiam auxiliar na patogênese, na resposta inflamatória e nas lesões pulmonares.

Nós analisamos a produção de fatores inflamatórios produzidos pelas células endoteliais. Sabe-se que GM-CSF, IL-1β, IL-6 e as quimicionas MCP-1, RANTES e KC, MIP-1α e seus receptores, CCR1 (RANTES e MIP-1α), CCR3 (MIP-1α), e CCR2 (MCP-1, 3, e 5) já foram implicados no desenvolvimento da SDRA (DENG; STANDIFORD, 2011).

O GM-CSF foi identificado inicialmente como estimulador do crescimento de granulócitos e macrófagos de progenitores hematopoiéticos. Porém, a purificação de GM-CSF e produção de proteína recombinante permitiu amplos estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstraram outras atividades biológicas para GM-CSF, como fator de crescimento que afeta predominantemente as células da linhagem fagocítica, mas também estimula a produção de eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos e células dendríticas (TRAPNELL; WHITSETT, 2002). Além disso, o GM-CSF participa da homeostase do surfactante, da defesa pulmonar (TRAPNELL; WHITSETT, 2002), e também pode induzir fracamente a expressão de estruturas de adesão, em particular ICAM-1 (MANTOVANI; BUSSOLINO; DEJANA, 1992).

Nossos resultados mostraram que fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) está aumentado em células estimuladas com extrato do parasita, VEGF, IFN-γ e TNF em relação às células não estimuladas. Possivelmente, as células endoteliais pulmonares, via produção de GM-CSF, por um lado tentam proteger o parequima pulmonar mantendo a produção de surfactante, mas por outo lado contribuem para a expressão de ICAM-1 neste endotélio. A família da interleucina (IL)-1 é intimamente ligado à resposta imune inata. Esta ligação

tornou-se evidente após a descoberta do domínio citoplasmático da IL-1, o receptor tipo I, que é altamente homólogo aos domínios citoplasmáticos de todos Receptores tipo Toll (TLRs). Assim, respostas fundamentais como a indução de ciclooxigenase tipo 2, aumento da expressão de moléculas de adesão ou síntese de óxido nítrico são respostas de ambos os ligantes IL-1 e TLR. IL-1β é a citocina mais estudada da família IL-1 devido ao seu papel na mediação de doenças autoinflamatória (TRAPNELL; WHITSETT, 2002).

Entretanto, em realção a IL-1β somente foram detectadas baixas concentrações nos sobrenadantes das CEPP-DBA/2 nos diferentes estímulos utilizados e não foram tempo-dependente. Como as células endoteliais são capazes de produzir IL-1β (KINNUNEN et al., 2017; PAN et al., 2017), acreditamos que nos ensaios realizados não houve ativação do inflamassoma pelos componentes do parasita e consequentemente a pró-IL1b não foi clivada para sua forma ativa.

A IL-6 é uma citocina, descrita como fator estimulante de linfócito. Ela influencia respostas imune antígeno-específicas, sendo fundamental em infecções, câncer e inflamação, que leva a progressão da doença ou sustenta reações imunológicas. A deficiência de IL-6 deixa a imunidade inata e adaptativa prejudicada frente à infecção viral, parasitária e bacteriana (HUNTER; JONES, 2015; ROSE-JOHN, 2012).

Os níveis de IL-6 circulantes estão aumentados em pacientes com malária causada por *P. falciparum e P. vivax,* e está normalmente associado a ativação policlonal de células B. Também já foi observado que após o tratamento anti-malárico, os níveis de IL-6 diminuem e estão associados com a diminuição da hiperpirexia e parasitemia (WUNDERLICH et al., 2012). Nós observamos que a concentração de IL-6 estava aumentada em todos os estimulos utilizados, entretanto o tempo em que a produção dessa citocina foi maior variou de acordo com cada estímulo (VEGF e extrato 6 e 12 horas, IFN-γ 3 e 6 horas e TNF 12 horas). A concentração de IL-6 foi estatísticamente maior em células estimuladas por 12 horas com TNF. Embora não tenha sido observado diferenças estatísticas nos demais tempos, pôde-se observar um perfil tempo-dependente. Nossos resultados comprovam mais uma vez, em outro modelo experimental, a importância desta citocina e seu efeito sinérgico com demais fatores inflamatórios ou do parasita.

A quimiocina KC (keratinocyte- derived chemokine), homóloga às quimiocinas CXCL1 humanas, GROα e MGSA, é tida como a citocina mais relevante no

recrutamento de neutrófilos para os pulmões de camundongos e no lavado broncoalveolar (CXCL1) de pacientes com SDRA (GOODMAN et al., 2003; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; KONRAD; REUTERSHAN, 2012) (DENG; STANDIFORD, 2011). Nós observamos que estímulos do parasita (EP-PbA e extrato) aumentaram a produção de KC e, em especial, o extrato que apresentou um pico com cerca de 800 mg/ml em 24 horas de estímulo. Anteriormente, nós havíamos demonstrado que o aumento sistêmico dessa citocina tem implicações bastante relevantes na patogênese da SDRA e que os neutrófilos tem um papel fundamental no desenvolvimento da síndrome (SERCUNDES et al., 2016). Agora, nós mostrando que as próprias células endoteliais produzem KC e, portanto, tem a capacidade de recrutar neutrófilos frente a antígenos parasitários, como dos plasmódios.

A liberação de KC também foi evidente, apesar de oscilar de acordo com os tempos de estímulo, em células estimuladas com IFN-γ e TNF, mas apresentou um pico com 6 horas de estímulo com TNF e LPS. Nesse mesmo tempo, pôde-se observar um aumento em células estimuladas com EP-PbA e extrato, sugerindo que estímulos provenientes do *Plasmodium berghei* ANK pode contribuir para a liberação de KC e esse aumento pode ser exacerbado com fatores inflamatórios.

A proteina quimioatrativa de monócios (MCP) -1 é um membro da subfamília de quimiocinas CC. O MCP-1 exerce seus efeitos através da ligação aos receptores acoplados à proteína G na superfície de leucócitos direcionados para ativação e migração. O papel do MCP-1 e do seu receptor CCR2 no recrutamento de monócitos durante a infecção ou sob outras condições inflamatórias é bem conhecido (YADAV; SAINI; ARORA, 2010), inclusive em distúrbios inflamatórios do pulmão como asma alérgica, fibrose pulmonar idiopática e a síndrome de bronquiolite obliterante (ROSE; SUNG; FU, 2003).

Nossos resultados monstraram que MCP-1 também teve a concentração aumentada com estímulos do parasita (EP-PbA e extrato), sendo que com extrato houve um perfil tempo-dependente, assim como o estímulo de IFN-γ. TNF e LPS induziram um pico de concentração de MCP-1 em 6 horas. Já no estímulo com IFN-γ, observou-se um perfil tempo-dependente. Assim, podemos inferir que tanto fatores do parasita quanto fatores inflamatórios podem contribuir para a liberação de MCP-1. Estes resultados sugerem que as céluas endoteliais iniciam a preparação para a

migração e ativação de monócitos quando os neutrófilos começam a ser substituídos por estas células.

RANTES (ou CCL5) é uma quimiocina inflamatória que recruta uma vasta variedade de leucócitos, incluindo monócitos, granulócitos, células T, mastócitos e células dendríticas, através das interações com os receptores de quimicionas CCR1, CCR3 e CCR5 (ØYNEBRÅTEN et al., 2015).

Na produção da quimiocina RANTES também observou-se um perfil tempo-dependente em extrato e TNF, mostrando a possível participação deste quimiocina no recurtamente de células inflamatórias. Entretanto, houve um aumento mais discreto em células estimuladas com EP-PbA, VEGF e IFN-γ, sugerindo um pouco sinergismos entre estes fatores e a liberação desta citocina.

Em células estimuladas com LPS pôde-se observar um aumento na concentração de todas as citocinas analisadas, com exceção de IL-1β, em diferentes tempos de estímulo, reforçando a ideia de exacerbação do processo inflamatório em co-infecções durante o desenvolvimento de SDRA-AM (HAQUE et al., 2004; HARTGERS; YAZDANBAKHSH, 2006).

Porém, houve um aumento de IL-6, KC, MCP-1 em células estimuladas com EnP em 12 e/ou 24 horas de estímulo, o que não era esperado, acreditamos que esse aumento possa ser decorrente a alguma contaminação artefatual dos poços da cultura, apesar de não descartar a possibilidade de antígenos bacterianos presentes no sangue coletado dos animais não infectados, que poderia ter permanecido apesar das centrifugações e lavagens.

Nosso estudo corrobora e fornece novas evidências tanto *in vivo* quanto *in vitro,* não somente que EP-PbA são capazes de aderir às células endoteliais, mas também a importância de citocinas inflamatórias, como TNF, favorecendo esta adesão. Através de ensaios de adesão estático e em fluxo de EP-PbA em CEPP–DBA/2 observamos que há uma maior adesão de EP-PbA em células estimuladas com TNF.

Demonstramos também que o TNF, IFN-γ podem aumentar a expressão gênica de ICAM-1 (além do LPS utilizado como controle positivo) em células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2. A molécula de adesão, ICAM-1 tem um papel importante na resposta imune inata e adaptativa, pois está envolvida na adesão de neutrófilos em células endoteliais, preparando-os para as migrações transendotelial e, posteriormente, para os locais da inflamação (LAWSON; WOLF,

2009). O ICAM-1 também interage com antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) e com células T (LAWSON; WOLF, 2009). Além disso, a interação entre eritrócitos parasitados e moléculas de adesão, tais como ICAM-1, CD36 e CSA, foi associada à patogênese e às formas graves das infecções causadas por *P. falciparum* (AIRD; MOSNIER; FAIRHURST, 2014). Nessas infecções, ocorrem modificações na superfície do eritrócito, tornando-o rígido e inflexível devido à exportação de proteínas específicas para a membrana do eritrócito, o que dificulta a circulação através da microvasculatura e favorece a adesão dos eritrócitos parasitados às células endoteliais. Esta adesão é mediada pela proteína do parasita PfEMP-1, que interage com uma série de receptores de superfície como ICAM-1, PECAM-1, CD36. Esta interação já foi relacionada com a patogênese, especialmente da malária cerebral (MC) (HUGHES; BIAGINI; CRAIG, 2010; RÉNIA et al., 2012; SHERMAN; EDA; WINOGRAD, 2003).

Porém, El-Assad e colaboradores demonstraram que o bloqueio de ICAM-1 não reduziu a adesão EP-PbA aderidos em células endoteliais primárias de pulmões de camundongos CBA/Ca, mas verificaram que bloqueio de VCAM-1 levou a uma redução de 65 % desta adesão (EL-ASSAAD et al., 2013). Nossos resultados também apontam para o envolvimento do VCAM na adesão de EP-PbA em CEPP-DBA/2, uma vez que observamos um aumento na expressão gênica de VCAM-1, especialmente em células tratadas com TNF e IFN-γ. Em relação ao CD36, receptor *scarvenger,* já foi demostrado que o mesmo é importante para a adesão de eritrócitos parasitados no desenvolvimento de complicações pulmonares na malária (FRANKE-FAYARD et al., 2005, 2010), uma vez que camundongos CD36$^{-/-}$ não apresentam sequestro de parasita nos pulmões e no tecido adiposo, mas continuam a desenvolver MC (FRANKE-FAYARD et al., 2005; LOVEGROVE et al., 2008). No entanto, até o momento, não encontramos fortes evidências que corroborem com a importância do CD36 na adesão de EP-PbA no nosso modelo de SDRA associado à malária. A expressão gênica de CD36 em CEPP-DBA/2 apresentou em níveis muito semelhantes a de células NE e, em estudos prévios a expressão de CD36 em pulmões de animais SDRA foram muito próximos de animais não infectados ou de camundongos que desenvolveram HP (ORTOLAN, 2013). Porém, foi observado marcação mais evidente de CD36 nos pulmões (por imunoistoquímica) em animais infectados em relação aos não infectados. Entretanto, os animais que

desenvolveram HP apresentaram maior expressão do CD36 que os animais SDRA, o que, mais uma vez, não confirma os achados descritos da literatura.

Interessantemente, nós evidenciamos que o tratamento com TNF (24 e 48 horas), o qual promove a citoadesão, também aumenta a expressão gênica de EPCR (*endothelial protein C receptor*). Um estudo recente de Turner e colaboradores mostraram que a variante da PfEMP1 DC8 e DC13 se liga ao EPCR e que esta adesão está associada à malária grave. A ligação foi observada na microvasculatura de diversos tecidos, incluindo o cérebro e os pulmões (AIRD; MOSNIER; FAIRHURST, 2014; TURNER et al., 2013).

EPCR tem uma função importante na via anticoagulante da proteína C. Quando a APC (proteína C ativada) se liga ao EPCR medeia diversas atividades biológicas incluindo efeitos anti-inflamatórias, anti-apoptóticas, aumenta a proteção da barreira endotelial e induz proliferação celular. Ainda, o EPCR pode ser destacado da superfície da célula pela enzima ADAM17/ TACE, tornando-se solúvel sEPCR (QU et al., 2007).

Em outro estudo recente, demostrou-se que há uma relação entre a biomassa do parasita (determinada pela carga parasitária indicada pelos níveis séricos de histidina rico em proteína 2) e a hospitalização e a severidade da doença e, ainda, que os receptores como o EPCR aderem ao PfEMP1 e que esta ligação pode contribuir para a virulência do parasita (BERNABEU et al., 2016). Sabe-se que a Proteina C ativada (APC, do inglês *activated protein C*) é importante na regulação da coagulação, da inflamação e da barreira endotelial. A ativação da APC é crítica na regulação negativa da coagulação sanguínea, inativa os co-fatores VIIIa e Va, responsáveis pela amplificação das reações de coagulação sanguínea que levam à geração de trombina (RAO; ESMON; PENDURTHI, 2014)

Ainda, a ligação de domínios de PfEMP1 do parasita com EPCR leva a diferentes mecanismos patogênicos. Ademais, Bernabeu e colaboradores verificaram que isolados de *P. falciparum* provenientes de pacientes com malária grave em população adulta na Índia, apresentaram aumento de genes de virulência (*var genes)* que codificam domínios de pfEMP1 que se ligam a EPCR (os domínios DC8 e DC6). Os domínios de DC8 têm diferentes afinidades de ligação e o bloqueio do ligante de APC, prejudica a ligação APC-EPCR e promove assim, a disfunção vascular e o aumentado a permeabilidade vascular (BERNABEU et al., 2016). Esses resultados sugerem que o EPCR, além de estar envolvido na citoadesão do EP-PbA,

possa estar contribuir para o aumento da permeabilidade vascular no nosso modelo experimental (ORTOLAN et al., 2014).

Verificamos ainda que as próprias células endoteliais são capazes de produzir TNF quando estimuladas com eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA, contribuindo para o microambiente favorável para a adesão do EP-PbA, pois leva ao aumento de moléculas de adesão.

Os ensaios em transwell com macrófagos peritoneais estimulados com EP-PbA mostrou claramente que EP-PbA são capazes de ativar os macrófagos peritoneais, estimular a liberação de TNF e favorecer a citoadesão em células endoteliais, elucidando a importância dos macrófagos nesse panorama.

Já nos ensaios em transwell com neutrófilos coletados da medula óssea, também foi observada maior adesão de eritrócitos parasitados. Entretanto, não foi observada a liberação de TNF, IL-6 ou IL-10, o que sugere que outros fatores inflamatórios também podem estar envolvidos no aumento da expressão de moléculas de adesão.

No modelo isolado com as CEPP, também observamos que células tratadas com EP-PbA apresentam maior permeabilidade em realção a essas células tratadas com dexametasona onde a permeabilidade é preservada. Além disso, observamos através da marcação de filamentos de actina (Phalloidina), que a dexametasona protege a abertura de junções interendoteliais. A indução de injúria respiratória por sulfito de hidrogênio (H_2S) diminui significativamente a expressão proteica de claudina-5 em ratos e células HUVECS (células endoteliais da veia umbilical humana) (GENG et al., 2017). As claudinas são proteinas que fazem parte das junções de oclusão e consistem em complexos de proteinas transmembrana que medeiam a adesão célula-célula (ZIHNI et al., 2016). Entretanto, quando Geng e colaboradores trataram os animais e as células com dexametasona, essa expressão da claudina aumentou (GENG et al., 2017). Esses resultados corroboram com os nossos achados onde a dexametasona diminui a permeabilidade vascular *in vivo* e *in vitro,* dessa maneira podemos hipotetizar que a expressão de claudina-5 esteja diminuída em animais infectados que apresentam SDRA e aumentada em animais e em CEPP-DBA/2 tratados com dexametasona. Porém, esta hipótese necessidade ser comprovada em estudos subsequentes.

Nossos resultados, em conjunto, indicam que fatores inflamatórios, especialmente o TNF, são essenciais para a aderência de EP e para a patogênese

de SDRA. Com o intuito de observar os efeitos da redução da inflamação, tratamos os camundongos DBA/2 com dexametasona. Observamos que esses camundongos ficaram protegidos da SDRA e tiveram uma regulação negativa na expressão gênica de EPCR, indicando que EPCR pode ser importante para a aderência EP-PbA e para o progresso patológico da doença. Além disso, os camundongos tratados com dexametasona são menos suscetíveis ao aumento da permeabilidade vascular, assim como as CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA e tratados com dexametasona, que apresentaram menor permeabilidade comparado às células não tratadas. Portanto, nossos resultados sugerem que a dexametasona protege os animais da SDRA impedindo a abertura dos espaços entre as junções interendoteliais das CEPP, tanto de junções comunicantes (via TNF e contração do citoesqueleto) quanto de junções oclusivas (via diminuição de claudina) e, consequentemente, reduzindo permeabilidade vascular pulmonar nos animais.

Em conclusão, podemos inferir que a adesão de eritrócitos parasitados nas células endoteliais pulmonares é importante para o desenvolvimento da SDRA-AM, que os fatores inflamatórios são essenciais para desencadear a expressão de moléculas de adesão, ativação das células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular pulmonar. Ademais, ressaltamos que estes mecanismos acima descritos podem ser alvos importantes no tratamento da SDRA-AM. O tratamento desta enfermidade com glicocorticódeis em associação ao controle parasitário com anti-malárico pode ser considerada para uma terapêutica eficiente, com a diminuição da morbidade e mortalidade de pacientes com SDRA-AM.

7 CONCLUSÕES

- Camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA que desenvolvem SDRA vão à óbito entre o 7º e 12º dpi e apresentam aumento da pausa respiratória e diminuição da frequência respiratória;
- Camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA que desenvolvem SDRA apresentam maior acúmulo de eritrócitos parasitados nos pulmões em em relação aos animais que desenvolvem HP, sugerindo fortemente que este acumulo está envolvido na patogênese desta síndrome;
- Animais que desenvolvem SDRA apresentam maior marcação de ICAM-1 nos pulmões em relação a animais HP no 7º dpi;
- Apesar da dexametasona não diminuir a mortalidade dos camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA, este fármaco diminui a inflamação e protege do desenvolvimento da SDRA;
- Dexametasona também é capaz de diminuir o aumento da permeabilidade vascular pulmonar em animais tratados, bem como em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/ (CEPP-DBA/2) estimuladas;
- Eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA (EP-PbA) são capazes de aderir nas CEPP–DBA/2 *ex vivo* e a adesão é maior na presença de citocinas pró-inflamatórios como IFN-γ e TNF;
- TNF é capaz de aumentar a expressão gênica de ICAM-1, VCAM e EPCR, atuando como um importante indutor inflamatório na patogênese da SDRA;
- EP-PbA não aumentam diretamente a expressão de moléculas de adesão, mas estimulam a produção de TNF;
- IFN-γ é capaz de aumentar a expressão gênica de ICAM-1 contribuindo para a citoadesão de EP-PbA;
- Dexametasona protege as células endoteliais do aumento da permeabilidade através da diminuição da abertura de junções interentdoteliais.

REFERÊNCIAS*

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782–787, 17 ago. 2000.

AHMED, M. A.; COX-SINGH, J. Plasmodium knowlesi - an emerging pathogen. **ISBT science series**, v. 10, n. Suppl 1, p. 134–140, 2015.

AIRD, W. C.; MOSNIER, L. O.; FAIRHURST, R. M. Plasmodium falciparum picks (on) EPCR. **Blood**, v. 123, n. 2, p. 163–167, 2014.

AITKEN, E. 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.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 24 fev. 2006.

AL-HARBI, N. O. et al. Dexamethasone Attenuates LPS-induced Acute Lung Injury through Inhibition of NF-κB, COX-2, and Pro-inflammatory Mediators. **Immunological investigations**, v. 45, n. 4, p. 349–369, 2016.

AMANTE, F. H. et al. Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 6, p. 3632–3642, 15 set. 2010.

ANSTEY, N. M. et al. Pulmonary manifestations of uncomplicated falciparum and vivax malaria: cough, small airways obstruction, impaired gas transfer, and increased pulmonary phagocytic activity. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 9, p. 1326–1234, 1 maio 2002.

ANSTEY, N. M. et al. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 4, p. 589–596, 15 fev. 2007.

ANTINORI, S. et al. Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. e2012013, jan. 2012.

AREND, W. P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunological reviews**, v. 223, p. 20–38, jun. 2008.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 6, p. 2956–2963, set. 2002.

ASHBAUGH, D. G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, v. 2, n. 7511, p. 319–323, 12 ago. 1967.

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

AVRIL, M. et al. Interaction between Endothelial Protein C Receptor and Intercellular Adhesion Molecule 1 to Mediate Binding of *Plasmodium falciparum* -Infected Erythrocytes to Endothelial Cells. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 615-616, 2016.

BARBAS VALENTE, C. S. et al. III Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. S2, p. 128–136, 2007.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 245–254, 2006.

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

BAZZONI, G. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 869–901, 2004.

BEESON, J. G.; BROWN, G. V. Pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 59, n. 2, p. 258–271, fev. 2002.

BERNABEU, M. et al. Severe adult malaria is associated with specific PfEMP1 adhesion types and high parasite biomass. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 1, p. 201524294, 2016.

BHARGAVA, M.; WENDT, C. H. Biomarkers in acute lung injury. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 159, n. 4, p. 205–217, abr. 2012.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **The Journal of pathology**, v. 202, n. 2, p. 145–156, fev. 2004.

BOBADILLA, N. A. et al. Dexamethasone increases eNOS gene expression and prevents renal vasoconstriction induced by cyclosporin. **The American journal of physiology**, v. 277, n. 3 Pt 2, p. F464-71, set. 1999.

BOSTROM, S. et al. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to Plasmodium falciparum infection in children living in sympatry in Mali. **Malaria journal**, v. 11, n. 1, p. 109, 5 abr. 2012.

BOULOS, M.; COSTA, J. M.; TOSTA, C. E. [Pulmonary involvement in malaria (review)]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 1, p. 93–102, 1993.

BRENNER, D.; BLASER, H.; MAK, T. W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 6, p. 362–374, 2015.

CABRERA, A.; NECULAI, D.; KAIN, K. C. CD36 and malaria: Friends or foes? A decade of data provides some answers. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 9, p. 436–444, 2014.

CARVALHO, B. O. et al. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. **The Journal of infectious diseases**, v. 202, n. 4, p. 638–647, 15 ago. 2010.

CARVALHO, L. H. et al. IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. **Nature medicine**, v. 8, n. 2, p. 166–70, fev. 2002.

CHANG, K.-H.; STEVENSON, M. M. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 13–14, p. 1501–1516, dez. 2004.

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. 119–128, jul. 1995.

CHOTIVANICH, K. et al. Plasmodium vivax adherence to placental glycosaminoglycans. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–7, 2012.

CLARK, C.; MACKAY, G. Prolonged survival of a murine model of cerebral malaria by kynurenine pathway inhibition. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 5249–5251, 2005.

COBAN, C. et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 1, p. 19–25, 3 jan. 2005.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 5, jan. 2010.

CRAIG, A. G.; KHAIRUL, M. F. M.; PATIL, P. R. Cytoadherence and severe malaria. **The Malaysian journal of medical sciences : MJMS**, v. 19, n. 2, p. 5–18, abr. 2012.

CUNNINGHAM, D. A. et al. ICAM-1 is a key receptor mediating cytoadherence and pathology in the Plasmodium chabaudi malaria model. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 185, 2017.

DE LAS SALAS, B. et al. Adherence to human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) of Plasmodium vivax isolates from Colombia. **Malaria journal**, v. 12, p. 347, jan. 2013.

DE SOUZA, J. B.; RILEY, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 4, n. 3, p. 291–300, mar. 2002.

DENG, J. C.; STANDIFORD, T. J. Growth Factors and Cytokines in Acute Lung Injury. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. January, p. 81–104, 2011.

DEROOST, K. et al. Hemozoin Induces Lung Inflammation and Correlates with Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 48, n. C, p. 1–50, 17 jan. 2013.

DESCHEEMAEKER, P.-N. et al. Near-fatal multiple organ dysfunction syndrome induced by Plasmodium malariae. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 5, p. 832–4, maio 2009.

EL-ASSAAD, F. et al. Cytoadherence of plasmodium berghei-infected red blood cells to murine brain and lung microvascular endothelial cells in vitro. **Infection and immunity**, v. 81, n. 11, p. 3984–3991, 12 ago. 2013.

ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and inflammation. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 7, p. 656–665, 17 fev. 2011.

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

FATIH, F. A et al. Cytoadherence and virulence - the case of Plasmodium knowlesi malaria. **Malaria journal**, v. 11, n. 1, p. 33, jan. 2012.

FRANKE-FAYARD, B. et al. From The Cover: Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 32, p. 11468–11473, 9 ago. 2005.

FRANKE-FAYARD, B. et al. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: Can we learn anything from rodent models of malaria? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. e1001032, jan. 2010.

FREITAS DO ROSARIO, A. P.; LANGHORNE, J. T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation of host responses during malaria. **International journal for parasitology**, 24 abr. 2012.

FRITZ, J. H. et al. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nature immunology**, v. 7, n. 12, p. 1250–1257, dez. 2006.

FUDALA, R. et al. Does activation of the FcgammaRIIa play a role in the pathogenesis of the acute lung injury/acute respiratory distress syndrome? **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 118, n. 8, p. 519–526, abr. 2010.

GARCIA, C. R.; MARKUS, R. P.; MADEIRA, L. Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection. **Journal of biological rhythms**, v. 16, n. 5, p. 436–443, 1 out. 2001.

GAY, N. J.; GANGLOFF, M. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 141–165, 2007.

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

GENG, P. et al. Dexamethasone ameliorates H_2S-induced acute lung injury by increasing claudin-5 expression via the PI3K pathway. **Human & Experimental Toxicology**, p. 96032711772196, 2017.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 94, n. 1–2, p. 57–63, 1986.

GOOD, M. 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, p. 69–99, jan. 2005.

GOODMAN, R. B. et al. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 6, p. 523–535, dez. 2003.

GREENWOOD, B. M. et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1266–1276, abr. 2008.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 17, n. 3–4, p. 293–307, 2011.

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 297–316, mar. 2011.

HAN, S.; MALLAMPALLI, R. K. The Acute Respiratory Distress Syndrome: From Mechanism to Translation. **The Journal of Immunology**, v. 194, p. 855–860, 2015.

HANUM, S. P.; HAYANO, M.; KOJIMA, S. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to Plasmodium berghei ANKA infection: Early chemokine expression in the brain. **International Immunology**, v. 15, n. 5, p. 633–640, 2003.

HAQUE, A et al. Co-infection of malaria and gamma-herpesvirus: exacerbated lung inflammation or cross-protection depends on the stage of viral infection. **Clinical and experimental immunology**, v. 138, n. 3, p. 396–404, dez. 2004.

HARTGERS, F. C.; YAZDANBAKHSH, M. Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. **Parasite immunology**, v. 28, n. 10, p. 497–506, out. 2006.

HEARN, J. et al. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. **Infection and immunity**, v. 68, n. 9, p. 5364–5376, set. 2000.

HEE, L. et al. Reduced activity of the epithelial sodium channel in malaria-induced pulmonary oedema in mice. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 1, p. 81–8, jan. 2011.

HEGEMAN, M. A. et al. Dexamethasone Attenuates VEGF Expression and Inflammation but Not Barrier Dysfunction in a Murine Model of Ventilator-Induced Lung Injury. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–8, 2013.

HERMANNS, M. I. et al. LPS-induced effects on angiotensin I-converting enzyme expression and shedding in human pulmonary microvascular endothelial cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 50, p. 287–295, 2013.

HUGHES, K. R.; BIAGINI, G. A; CRAIG, A. G. Continued cytoadherence of Plasmodium falciparum infected red blood cells after antimalarial treatment. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 169, n. 2, p. 71–78, fev. 2010.

HULDEN, L.; HULDEN, L. Activation of the hypnozoite: a part of Plasmodium vivax life cycle and survival. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p. 90, jan. 2011.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature Immunology**, v. 16, n. 5, p. 448–457, 2015.

IMAIZUMI, T. et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1alpha. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 20, p. 410–415, 2000.

JAIN, S.; BELLINGAN, G. Basic science of acute lung injury. **Surgery (Oxford)**, v. 25, n. 3, p. 112–116, mar. 2007.

JANSE, C. J.; RAMESAR, J.; WATERS, A. P. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite Plasmodium berghei. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 346–356, jan. 2006.

JESPERSEN, J. S. et al. *Plasmodium falciparum var* genes expressed in children with severe malaria encode CIDRα1 domains. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 8, p. 839–850, 2016.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 461, 2014.

KIM, I. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor-κB Activation in Endothelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 10, p. 7614–7620, 2001.

KINNUNEN, K. et al. Lysosomal destabilization activates the NLRP3 inflammasome in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 11, n. 3, p. 275–279, 2017.

KITAMURA, Y. et al. Presence of mast cell precursors in peripheral blood of mice demonstrated by parabiosis. **Blood**, v. 53, n. 6, p. 1085–1088, jun. 1979.

KOBAYASHI, F. et al. Effects of in vivo administration of anti-IL-10 or anti-IFN-gamma monoclonal antibody on the host defense mechanism against Plasmodium yoelii yoelii infection. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 62, n. 6, p. 583–587, jun. 2000.

KOHLSTEDT, K. et al. Angiotensin-Converting Enzyme Is Involved in Outside-in Signaling in Endothelial Cells. **Circulation Research**, v. 94, n. 1, p. 60–67, 2004.

KONRAD, F. M.; REUTERSHAN, J. CXCR2 in acute lung injury. **Mediators of inflammation**, v. 2012, p. 740987, jan. 2012.

KRISHNA, C. V. R. et al. Acute renal failure in falciparum malaria: clinical characteristics, demonstration of oxidative stress, and prognostication. **Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia**, v. 23, n. 2, p. 296–300, mar. 2012.

KRISHNEGOWDA, G. et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8606–8016, 4 mar. 2005.

KROLL, J.; WALTENBERGER, J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 252, n. 3, p. 743–746, 1998.

LACERDA, M. V. G. et al. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of Plasmodium vivax malaria: to what extent does this parasite kill? **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 55, n. 8, p. e67-74, out. 2012.

LACERDA, M. V. G. **A malária no Brasil**. Disponível em: <http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/publications/Malaria in Brazil PT.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2015.

LANGE, M. et al. Pulmonary microvascular hyperpermeability and expression of vascular endothelial growth factor in smoke inhalation- and pneumonia-induced acute lung injury. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, p. 1–7, 28 maio 2012.

LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. **Pharmacological reports : PR**, v. 61, n. 1, p. 22–32, 2009.

LEE, E. Y.; MAGUIRE, J. H. Acute pulmonary edema complicating ovale malaria. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 29, n. 3, p. 697–698, set. 1999.

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. 402–408, dez. 2001.

LOIOLA, R. A. et al. Generation and characterization of a spontaneously immortalized endothelial cell line from mice microcirculation. **Experimental Cell Research**, v. 319, p. 1102–1110, 2013.

LOIOLA, R. A. et al. Cellular Changes Induced by Kinin B1 Receptor Deletion: Study of Endothelial Nitric Oxide Metabolism. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 21, n. 3, p. 375–382, 9 set. 2015.

LOMASK, M. Further exploration of the Penh parameter. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 57 Suppl 2, p. 13–20, jun. 2006.

LOVEGROVE, F. E. et al. Simultaneous host and parasite expression profiling identifies tissue-specific transcriptional programs associated with susceptibility or resistance to experimental cerebral malaria. **BMC genomics**, v. 7, p. 295, jan. 2006.

LOVEGROVE, F. 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, maio 2008.

LUNDIE, R. J. Antigen presentation in immunity to murine malaria. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 1, p. 119–123, fev. 2011.

LUTY, A. J. et al. Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 3909–3015, jul. 2000.

MADERNA, P. et al. Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 6, p. 3727–3733, 2005.

MAGGIORINI, M. Prevention and treatment of high-altitude pulmonary edema. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 52, n. 6, p. 500–506, 2010.

MAIRBÄURL, H.; BALOGLU, E. Con: Corticosteroids Are Useful in the Management of HAPE. **High Altitude Medicine & Biology**, v. 16, n. 3, p. 190–192, 2015.

MAKNITIKUL, S. et al. Dysregulation of pulmonary endothelial protein C receptor and thrombomodulin in severe falciparum malaria-associated ARDS relevant to hemozoin. **Plos One**, v. 12, n. 7, p. e0181674, 2017.

MANTOVANI, A; BUSSOLINO, F.; DEJANA, E. Cytokine regulation of endothelial cell function. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, p. 2591–2599, 1992.

MATTHAY, M. A.; ZEMANS, R. L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. **Annual review of pathology**, v. 6, n. 16, p. 147–1463, 5 jan. 2011.

MAYBAUER, M. O.; MAYBAUER, D. M.; HERNDON, D. N. Incidence and outcomes of acute lung injury. **The New England journal of medicine**, v. 354, p. 416-417, 2006.

MEDEIROS, K. et al. Malária em Cruzeiro do Sul (Amazônia Ocidental brasileira): análise da série histórica de 1998 a 2008. **Revista Panamericana De Salud Publica**, v. 28, n. 1, 2010.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135–145, nov. 2001.

MIETTINEN, M. et al. Ulex europaeus I lectin as a marker for tumors derived from endothelial cells. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 79, n. 1, p. 32–36, 1983.

MILLAR, F. R. et al. The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome: insights and therapeutic opportunities. **Thorax**, v. 71, n. 5, p. 462–473, 2016.

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–679, 7 fev. 2002.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature medicine**, v. 19, n. 2, p. 156–167, fev. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. **Ministério da Saúde**, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília. 2016.

MITCHELL, A. J. et al. Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria. **Infection and immunity**, v. 73, n. 9, p. 5645–5653, set. 2005.

MIYAKE, M. et al. Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 93, n. 7, p. 768–778, jul. 2013.

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, set. 2008.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOSNIER, L. O.; LAVSTSEN, T. The role of EPCR in the pathogenesis of severe malaria. **Thrombosis Research**, v. 141, p. S46–S49, 2016.

MOTA, M. M. et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5501, p. 141–144, 5 jan. 2001.

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. 149–163, 1996.

NAING, C. et al. Is Plasmodium vivax Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 2014.

NERES, R. et al. Pregnancy outcome and placenta pathology in Plasmodium berghei ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. e1608, jan. 2008.

NEVES, D. P. ET AL. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo. 2005.

NIIKURA, M.; INOUE, S.; KOBAYASHI, F. Role of interleukin-10 in malaria: focusing

on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 383962, jan. 2011.

O'LEARY, E. C.; EVANS, G. F.; ZUCKERMAN, S. H. In vivo dexamethasone effects on neutrophil effector functions in a rat model of acute lung injury. **Inflammation**, v. 21, n. 6, p. 597–608, dez. 1997.

O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 453–460, 2013.

OLANIYAN, S. A. et al. Tumour necrosis factor alpha promoter polymorphism, TNF-238 is associated with severe clinical outcome of falciparum malaria in Ibadan southwest Nigeria. **Acta Tropica**, v. 161, p. 62–67, 2016.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria journal**, v. 9, p. 115, jan. 2010.

OLUPOT-OLUPOT, P.; MAITLAND, K. Management of severe malaria: results from recent trials. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 764, p. 241–250, jan. 2013.

ORTOLAN, L. S. **Caracterização da resposta inflamatória frente à injúria respiratória aguda murina/ síndrome do desconforto respiratório agudo associado á malária grave**. 2017. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Química). Instituto de Ciências Ambientais, químicas e farmacêuticas. Universidade Federal de São Paulo, 2013.

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

ØYNEBRÅTEN, I. et al. Oligomerized, filamentous surface presentation of RANTES/CCL5 on vascular endothelial cells. **Scientific reports**, v. 5, p. 9261, 2015.

OZEN, M. et al. Cerebral malaria owing to Plasmodium vivax : case report. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 26, n. 2, p. 141–144, 29 jun. 2006.

PAMPLONA, A. et al. Cerebral malaria and the hemolysis/methemoglobin/heme hypothesis: shedding new light on an old disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 4, p. 711–716, abr. 2009.

PAN, L. et al. Shear stress induces human aortic endothelial cell apoptosis via interleukin-1 receptor-associated kinase 2-induced endoplasmic reticulum stress. **Molecular Medicine Reports**, p. 7205–7212, 2017.

PARROCHE, P. et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 6, p. 1919–1924, 6 fev. 2007.

PEREIRA, M. L. M. et al. Association of Heme Oxygenase 1 with Lung Protection in Malaria-Associated ALI/ARDS. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

PICHYANGKUL, S. et al. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 8, p. 4926–4933, 15 abr. 2004.

PINO, P. et al. Plasmodium falciparum--infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. **The Journal of infectious diseases**, v. 187, n. 8, p. 1283–1290, 15 abr. 2003.

POOVASSERY, J.; MOORE, J. M. Association of malaria-induced murine pregnancy failure with robust peripheral and placental cytokine responses. **Infection and immunity**, v. 77, n. 11, p. 4998–5006, nov. 2009.

POUVELLE, B. et al. Cytoadhesion of Plasmodium falciparum ring-stage-infected erythrocytes. **Nature medicine**, v. 6, n. 11, p. 1264–1268, nov. 2000.

PRADEL, G.; FREVERT, U. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 33, n. 5, p. 1154–1165, maio 2001.

PRICE, L. 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. 655–659, jul. 2007.

PUNEET, P.; MOOCHHALA, S.; BHATIA, M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 288, n. 1, p. L3-15, jan. 2005.

QU, D. et al. Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-a converting enzyme / ADAM17. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 17, p. 395–402, 2007.

RAO, L. V. M.; ESMON, C. T.; PENDURTHI, U. R. **Endothelial cell protein C receptor: A multiliganded and multifunctional receptorBlood**, 2014.

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 273, 2017.

REISS, L. K.; UHLIG, U.; UHLIG, S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. **European journal of cell biology**, v. 91, n. 6–7, p. 590–601, 2012.

RÉNIA, L. et al. Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 193–201, 2012.

RILEY, E. M. et al. Regulating immunity to malaria. **Parasite immunology**, v. 28, n. 1–2, p. 35–49, 2006.

RISCILI, B. P. et al. An assessment of H1N1 influenza-associated acute respiratory distress syndrome severity after adjustment for treatment characteristics. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e18166, jan. 2011.

RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays**. Assay Guidance Manual. 2004.

ROSE-JOHN, S. Il-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 9, p. 1237–1247, 2012.

ROSE, C. E.; SUNG, S.-S. J.; FU, S. M. Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. **Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)**, v. 10, n. 3–4, p. 273–288, jun. 2003.

RUBENFELD, G. D. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 16, p. 1685–1693, 20 out. 2005.

SARAIVA, M. DAS G. G. et al. Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 515–522, 2009.

SARKAR, S.; SAHA, K.; DAS, C. S. Three cases of ARDS: An emerging complication of Plasmodium vivax malaria. **Lung India : official organ of Indian Chest Society**, v. 27, n. 3, p. 154–157, jul. 2010.

SCHOCH, H. J.; FISCHER, S.; MARTI, H. H. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. **Brain : a journal of neurology**, v. 125, n. Pt 11, p. 2549–57, nov. 2002.

SCHOFIELD, L. Intravascular infiltrates and organ-specific inflammation in malaria pathogenesis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 130–137, fev. 2007.

SEMERAD, C. L. et al. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. **Immunity**, v. 17, n. 4, p. 413–423, 2002.

SERCUNDES, M. K. et al. Targeting neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute respiratory Distress Syndrome in Mice. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 12, p. e1006054, 2016.

SHABANI, E. et al. The endothelial protein C receptor rs867186-GG genotype is associated with increased soluble EPCR and could mediate protection against severe malaria. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 27084, 2016.

SHERMAN, I. W.; EDA, S.; WINOGRAD, E. Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: defining the ties that bind. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 10, p. 897–909, ago. 2003.

SILAMUT, K. et al. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. **The American journal of pathology**, v. 155, n. 2, p. 395–410, 1999.

SILVA, P. L.; PELOSI, P.; ROCCO, P. R. M. Recruitment maneuvers for acute

respiratory distress syndrome: The panorama in 2016. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 28, n. 2, p. 104–106, 2016.

SIQUEIRA, A. M. et al. Plasmodium vivax Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, n. Suppl 6, p. 1–21, 5 out. 2016.

SOUZA, M. C. et al. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 186, n. 1, p. 65–72, 14 jan. 2013.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 3, p. 169–180, mar. 2004.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science (New York, N.Y.)**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 1 set. 2006.

SUMPIO, B. E.; TIMOTHY RILEY, J.; DARDIK, A. Cells in focus: Endothelial cell. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, p. 1508–1512, 2002.

TA, T. H. et al. First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 68, 2014.

TAN, L. K. K. et al. Acute lung injury and other serious complications ofPlasmodium vivax malaria. **The Lancet infectious diseases**, v. 8, n. 7, p. 449–454, jul. 2008.

TAYLOR, W. R. J. et al. Respiratory manifestations of malaria. **Chest**, v. 142, n. 2, p. 492–505, ago. 2012.

THOMPSON, B. T. Glucocorticoids and acute lung injury. **Critical care medicine**, v. 31, n. 4 Suppl, p. S253–S257, 2003.

TRAMPUZ, A. et al. Clinical review: Severe malaria. **Critical care (London, England)**, v. 7, n. 4, p. 315–323, ago. 2003.

TRAORÉ, B. et al. Cytoadherence characteristics of Plasmodium falciparum isolates in Thailand using an in vitro human lung endothelial cells model. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 62, n. 1, p. 38–44, 2000.

TRAPNELL, B. C.; WHITSETT, J. A. GM-CSF Regulates Pulmonary Surfactant Homeostasis and Alveolar Macrophage-Mediated Innate Host Defense. **Annual Review of Physiology**, v. 64, n. 1, p. 775–802, mar. 2002.

TSUTSUI, H. et al. Cytokine-induced inflammatory liver injuries. **Current molecular medicine**, v. 3, n. 6, p. 545–559, set. 2003.

TURNER, G. D. et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. **The American journal of pathology**, v. 145, n. 5, p. 1057–1069, 1994.

TURNER, L. et al. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. **Nature**, v. 498, n. 7455, p. 502–505, 2013.

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British journal of cancer**, v. 56, p. 279–285, 1987.

UNGER, R. E. et al. In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. **Microvasc Res**, v. 64, n. 3, p. 384–397, 2002.

VAN DEN STEEN, P. 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, 1 maio 2010.

VAN DER HEYDE, H. 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. 503–508, nov. 2006.

VESTWEBER, D. VE-cadherin: The major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 2, p. 223–232, 2008.

VILLAR, J.; BLANCO, J.; KACMAREK, R. M. Current incidence and outcome of the acute respiratory distress syndrome. **Current Opinion in Critical Care**, v. 22, n. 1, p. 1–6, 2016.

VOELKEL, F. N.; ROUNDS, S. **The pulmonary endothelium**. 1. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009.

WALKEY, A. J. et al. Acute respiratory distress syndrome: epidemiology and management approaches. **Clinical Epidemiology**, v. 4, p. 159–169, 2012.

WALTHER, M. 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, mar. 2012.

WARD, P. A. Acute lung injury: how the lung inflammatory response works. **European Respiratory Journal**, v. 22, n. Supplement 44, p. 22s–23s, 20 set. 2003.

WHITE, N. J. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 2, p. 172–173, 15 jan. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2016**. [s.l: s.n.].

WOODRUFF, P. G. et al. Clinical Significance of Symptoms in Smokers with Preserved Pulmonary Function. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 19, p. 1811–1821, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2012**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2015**. [s.l: s.n.].

WUNDERLICH, C. M. et al. Cutting Edge: Inhibition of IL-6 Trans-Signaling Protects from Malaria-Induced Lethality in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4141–4144, 2012.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 21–22, p. 1570–1579, 2010.

YAÑEZ, D. M. et al. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 157, n. 4, p. 1620–1624, 15 ago. 1996.

ZEBROWSKI, B. K. et al. Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 5, n. 11, p. 3364–3368, 1999.

ZIHNI, C. et al. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 564–580, 2016.