

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

ESTUDO DA PERMEABILIDADE VASCULAR PULMONAR E DAS JUNÇÕES
INTERENDOTELIAIS NA MALÁRIA EXPERIMENTAL

Thatyane de Castro Quirino

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Epiphanyo

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Estudo da permeabilidade vascular pulmonar e das junções interendoteliais na
malária experimental

Thatyane de Castro Quirino

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre.
Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Epiphanyo

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Q355e QUIRINO, Thatyane de Castro
Estudo da permeabilidade vascular pulmonar e das junções interendoteliais na malária experimental / Thatyane de Castro QUIRINO. - São Paulo, 2018.
127 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Epiphânio, Sabrina

1. Malária. 2. Pulmão. 3. SDRA. 4. Tomografia computadorizada. 5. Junção celular. I. T. II.
Epiphânio, Sabrina, orientador.

Thatyane de Castro Quirino

Estudo da permeabilidade vascular pulmonar e das junções interendoteliais na
malária experimental

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Sabrina Epiphanio
Orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de _____.

RESUMO

QUIRINO, T.C. **Estudo da permeabilidade vascular pulmonar e das junções interendoteliais na malária experimental.** 2018. 127 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia, área de Fisiopatologia e Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Infecções por *Plasmodium* spp. podem acarretar em complicações pulmonares (1 a 40% dos casos), que podem resultar no desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Esta síndrome é caracterizada por inflamação aguda, lesão do endotélio alveolar e do parênquima pulmonar, disfunção e aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar pulmonar e, conseqüente, formação de efusão pleural. Neste sentido, os mecanismos de regulação da permeabilidade das células endoteliais e as junções interendoteliais têm papel crítico na manutenção do endotélio pulmonar. O objetivo do estudo foi determinar precocemente o desenvolvimento da SDRA associada à malária por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT/CT), além de identificar alterações nas junções interendoteliais das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2), após contato com os eritrócitos parasitados de *Plasmodium berghei* ANKA (EP-PbA). Os nossos resultados demonstraram que é possível identificar alterações na aeração pulmonar no 5º e 7º dia após a infecção e, conseqüentemente, diferenciar os animais que desenvolveriam SDRA daqueles que evoluiriam para hiperparasitemia (HP). Além disso, observamos em CEPP-DBA/2 que o contato direto com EP-PbA aumenta a abertura das junções interendoteliais e da permeabilidade vascular. Assim, avaliamos a diminuição da expressão das proteínas das junções interendoteliais que contribuem para o aumento da permeabilidade vascular, por imunofluorescência e Western Blot. Apesar da SDRA ter sido identificada há mais de 50 anos, ainda não se conhece formas de diagnóstico precoce e os mecanismos efetivos de desenvolvimento desta enfermidade, que permitam um tratamento efetivo e que evite a morte do paciente. Portanto, sugere-se que a técnica de SPECT/CT seja uma importante ferramenta de diagnóstico para identificação precoce de SDRA associado a malária.

Palavras Chave: Malária. Pulmão. Edema. SDRA. Tomografia. Junção celular.

ABSTRACT

QUIRINO, T.C. Study of pulmonary vascular permeability and interendothelial junctions in experimental malaria. 2018. 127 f. Dissertation (Master's Degree in Pharmacy, Physiopathology and Toxicology) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Infections by *Plasmodium* spp. can lead to pulmonary complications (1 to 40% of the cases), that can result in the development of acute respiratory distress syndrome (ARDS). This syndrome is characterized by the acute inflammation, injury of the alveolar endothelium and pulmonary parenchyma, dysfunction and increased permeability of the pulmonary alveolar-capillary barrier and, consequently, formation of pleural effusion. In this aspect, mechanisms of regulation of endothelial cell permeability and interendothelial junctions play a critical role in the maintenance of the pulmonary endothelium. The present study aimed to determine the early development of single-photon emission computed tomography (SPECT/CT) associated malaria ARDS in addition to identifying changes in the interendothelial junctions of the primary pulmonary endothelial cells of DBA/2 mice (CEPP-DBA/2) after contact with erythrocytes infected with *Plasmodium berghei* ANKA (EP-PbA). Our results demonstrated that is possible to identify changes in lung aeration on the 5th and 7th day after infection and, consequently, differentiate the animals that should develop ARDS from those that would evolve to hyperparasitemia (HP). In addition, we observed in CEPP-DBA/2 that direct contact with EP-PbA increases the opening of the interendothelial junctions and vascular permeability. Thus, we evaluated that decrease the expression of interendothelial junction proteins contribute to the increase of vascular permeability, by immunofluorescence and Western Blot. Although ARDS was identified more than 50 years ago, it is not yet known what forms of early diagnosis, and the effective mechanisms of development of this disease, that allow an effective treatment and that prevent the death of the patient. Therefore, it is suggested that the SPECT/CT technique is a valuable tool to promote the early identification of ARDS associated with malaria.

Keywords: Malaria. Lung. Edema. ARDS. Tomography. Cell junction.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Dra. Sabrina Epiphanyo quero agradecer por toda a paciência direcionada a mim, pelos conhecimentos compartilhados e suporte científico, que muito contribuiu para meu crescimento científico e profissional, e pela oportunidade de realizar o mestrado em seu laboratório.

Ao Professor Dr. Cláudio Romero Farias Marinho pelas críticas construtivas em relação ao trabalho e contribuição para realização dos experimentos, e a técnica de laboratório Erika Machado por todo o apoio científico.

Ao Dr. Walter Turato pela colaboração na realização dos ensaios de diagnóstico por imagem e análise dos dados, amizade e companheirismo nos longos dias de jornada de trabalho no IPEN, sem a sua ajuda este trabalho não seria possível, muito obrigada.

Aos Professores Dra. Dulcineia Saes Parra Abdala, Dr. Joilson de Oliveira Martins e Dr. Marcos Gazarini Dutra pelas contribuições científicas ao estudo durante o exame de qualificação.

À Me. Stephanie Oliveira pela ajuda e paciência em sanar as dúvidas nos ensaios de western blot e a Profa. Dra. Tania Marcourakis pela disponibilização do equipamento de revelação.

Agradeço aos meus amigos de laboratório Me. Patrícia Mendonça, Dra. Michelle Sercundes, Dra. Luana Ortolan “Luanita”, Gabriel Moura o “171” por todas as conversas científicas e não científicas, apoio emocional, amizade, companheirismo, por sempre ter paciência em ensinar as técnicas e solucionar as dúvidas e problemas, pela formação da família imunopatologia.

Agradeço aos meus melhores amigos Me. Douglas de Souza Costa, Me. Juliana Inês Blanco e mestrandos André Vinícius Nunes e Francielle Mosele pelo companheirismo nas disciplinas, ajuda na condução dos ensaios, pelos momentos de risadas e descontração, pelo apoio emocional e psicológico, amigos que vou levar da USP para o resto da vida.

Aos Dr. Leonardo Mendes Bella “Bagunça”, Dra. Mariana Mendes Brás, Dra. Carla Bandeira pela amizade, apoio e pela paciência em sanar as dúvidas, e a Me. Adriana Alejandra Rodriguez Marin, pela amizade e pelo companheirismo.

Agradeço aos meus familiares por todo apoio financeiro na realização deste estudo, gratidão pela compreensão, pelo carinho e pelo incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Ao Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química e ao Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, ambos da Universidade de São Paulo (IQ e ICB/USP) e seus funcionários, por dispor os animais e sua área experimental para a realização dos estudos pré-clínicos.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), seus laboratórios, funcionários e secretárias. Obrigada pela disposição em ajudar e pelas orientações prestadas.

Aos colegas e funcionários do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pela atenção e pelo apoio durante os ensaios experimentais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado processo 131431/2017-0, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Projeto 14/20451-0 e 17/05782-8 pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

(Marthin Luther King)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α-cat	Alfa catenina
ACE	Enzima Conversora de Angiotensina
AT	Área Total ocupada pela proteína
β+	Emissores de pósitrons
βcat	Beta catenina
BSA	Albumina do soro bovino (do inglês: Bovine serum albumin)
CCL2	Quimiocina (do inglês: C-C Motif Chemokine Ligand 2)
CD31	Cluster of differentiation 31
CD36	Cluster of differentiation 36
CD62e	Cluster of differentiation 62 endotelial ou E-Selectina
CEs	Células Endoteliais
CEPP-DBA/2	Células Endoteliais Pulmonares Primárias de camundongos DBA/2
CLDN	Claudina
Cx43	Conexina 43
CT	Tomografia Computadorizada (do inglês: <i>Tomography Computerized</i>)
Dpi	Dias após infecção (do inglês: Day pós infection)
DI	Densidade Integrada da proteína de interesse
EP-PbA	Eritrócitos Parasitados com esquizontes de <i>Plasmodium berghei</i> ANKA
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
HP	Hiperparasitemia
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IF	Imunofluorescência
IL	Inteleucina
Ip	intraperitoneal
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
JA	Junções Adesivas
JAM-B	Molécula de Adesão Juncional B
JC	Junções Comunicantes

JO	Junções de Oclusão
KC	Keratinocyte-derived chemokine semelhante a IL-8 de humanos
LPS	Lipopolissacarídeo
MAA	Macro Agregado de Albumina
MCB	Média de níveis de Cinza do Background
mg	Miligrama
mm	Milímetro
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês " <i>Neutrophils extracellular traps</i> ")
NI	Animais não infectados
nm	Nanômetro
OCL	Ocludina
PBS	Tampão Fosfato salino (do inglês: Phosphate Buffered Saline)
PET	Tomografia por emissão de pósitron (do inglês: Positron Emission Computed)
plako	Plakoglobina
RXT	Raio-x de Tórax
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
TCAR	Tomografia Computadorizada de Alta resolução
Tc⁹⁹	Tecnécio 99 metaestável
TNF-α	Fator de necrose tumoral –α (do inglês: "Tumor Necrosis Factor - α")
Ulex	Lectina Ulex europaeus
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: " <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ")
vWF	Fator de von Willebrand (do inglês: "von Willebrand Factor")
ZO-1	Zônula de Oclusão 1
WB	Western Blot
WHO	Organização mundial de saúde (do inglês: "World Health Organization")

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Epidemiologia da malária	14
1.2 Transmissão da malária	16
1.3 Diagnóstico Laboratorial da Malária	17
1.4 Tratamento da malária	18
1.5 As principais complicações durante a malária grave	19
1.6 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo associada a Malária	20
1.7 Uso de métodos de diagnóstico por imagem na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo	23
1.8 A permeabilidade vascular pulmonar na SDRA e os modelos experimentais para o estudo da malária	27
1.9 O papel das células endoteliais e das junções interendoteliais no controle da permeabilidade vascular	28
1.10 O estudo da junção de oclusão no aumento da permeabilidade vascular pulmonar	29
1.11 O papel das junções de adesão na permeabilidade vascular pulmonar	34
1.12 O papel da junção comunicante na permeabilidade vascular pulmonar	35
2 OBJETIVO GERAL	37
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Animais	38
3.2 Comitê de ética	38
3.3 Avaliação das parasitemias e da curva de sobrevivência dos animais	38
3.4 Análise da função respiratória	39
3.5 Identificação da síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária em modelo murino pela técnica de diagnóstico por imagem - SPECT/CT	40
3.5.1 Processamento e análise de imagens de CT	40
3.5.2 Experimento com SPECT/CT	40

3.6 Isolamento das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos da linhagem DBA/2 _____	43
3.7 Sincronização e isolamento de eritrócitos parasitados em esquizontes de <i>Plasmodium berghei</i> ANKA _____	44
3.8 Identificação dos microfilamentos de actina por imunofluorescência _____	46
3.9 Avaliação da abertura das junções interendoteliais _____	46
3.10 Ensaio da integridade da barreira endotelial _____	47
3.11 Ensaio de imunofluorescência para identificação das junções interendoteliais _____	48
3.12 Análise morfométrica das junções interendoteliais _____	48
3.13 Extração de proteínas das amostras para Western blot _____	49
3.14 Determinação de proteína total nas amostras celulares _____	49
3.15 Expressão de proteínas pela técnica de Western Blot _____	50
3.16 Análises estatísticas _____	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	51
4.1 Caracterização da síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária em modelo murino. _____	51
4.2 Caracterização e diagnóstico por imagem da síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária experimental por tomografia computadorizada _____	54
4.2.1 Avaliação da aeração pulmonar durante a síndrome do desconforto respiratório agudo associada a malária experimental _____	57
4.2.2 Aumento do tecido pulmonar não aerado pela tomografia computadorizada está associado com os parâmetros respiratórios durante a síndrome do desconforto respiratório agudo associada a malária experimental _____	62
4.3 Diminuição da perfusão pulmonar nos camundongos com síndrome do desconforto respiratório agudo. _____	65
4.4 Caracterização das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 _____	68
4.5 EP-PbA promovem o aumento dos espaços interendoteliais em monocamada de CEPP-DBA/2 _____	70

4.6 EP-PbA provocam o aumento da permeabilidade de células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2.	72
4.7 Caracterização das junções interendoteliais das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2	74
4.8 EP-PbA induzem a diminuição da Conexina 43 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2	75
4.9 EP-PbA promovem a diminuição da ocludina em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.	78
4.10 EP-PbA causam a diminuição da JAM-B em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2	81
4.11 EP-PbA induzem a diminuição da Claudina 5 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2	84
4.12 EP-PbA diminuem a expressão de VE-caderina em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2	87
4.13 EP-PbA provocam a diminuição da zônula de oclusão 1 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2	89
5 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
<i>Anexo 1: Terminologia específica aplicada na caracterização das estruturas pela técnica de tomografia computadorizada</i>	119
<i>Anexo 2: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)</i>	121
<i>Anexo 2.1: Aditivo do certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP</i>	122
<i>Anexo 3: Ciência da CEUA/FCF da aprovação do estudo no CEUA do ICB/USP</i>	123
<i>Anexo 4: Protocolo de imunofluorescência para caracterização das células endoteliais pulmonares primárias</i>	124
<i>Anexo 5: Protocolo de imunofluorescência das junções interendoteliais</i>	125
<i>Anexo Obrigatório: Ficha do aluno obtido do sistema JANUS</i>	126

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da malária

A malária é uma doença infecciosa parasitária, causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* (VAN DOOREN et al., 2005; COX, 2010), de grande impacto na saúde pública e na economia mundial (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018) . A transmissão ocorre através de picadas de mosquitos, especialmente do gênero *Anopheles* (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012). Existem mais de 400 espécies diferentes de mosquitos e 30 destes são vetores importantes da malária (FORATTINI, 1995). As espécies de *Plasmodium* que infectam os seres humanos são *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, *P. simium*, *P. cynomolgi* (CALDERARO et al., 2013; BRASIL et al., 2017).

Em 2016, mais de 90 países notificaram a transmissão da malária, a prevalência é de 216 milhões de casos e 445 mil mortes/ano (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012; COWMAN et al., 2016; WHO, 2017) cerca de 3,2 bilhões de pessoas, correm o risco de serem infectadas pela doença (HEMINGWAY et al., 2016).

Em 2018 no Brasil, nos meses de janeiro e fevereiro, houve um aumento de 56% nos casos autóctones de malária, quando comparado aos mesmos meses em 2017, sendo 36% pelo *Plasmodium falciparum*, (GARCIA, 2018). As infecções causadas por *P. falciparum* são responsáveis pelos casos mais graves e fatais, com alta prevalência na região subsaariana da África onde ocorre aproximadamente 90% dos casos e óbitos (KIRCHGATTER; DEL PORTILLO, 2005; MARCHIORI et al., 2013; WHO, 2017).

Na América do Sul, a Argentina e o Paraguai encontram-se em fase de eliminação da malária, enquanto o Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela estão em fase de controle da transmissão (RECHT et al., 2017). Entretanto, no Brasil, as espécies de *Plasmodium* mais prevalentes são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (MONTEIRO; RIBEIRO; FERNANDES, 2013; RECHT et al., 2017). No Brasil, país onde a malária é endêmica (Fig.1), 99% dos casos concentram-se na Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão) (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012; MONTEIRO; RIBEIRO; FERNANDES, 2013).

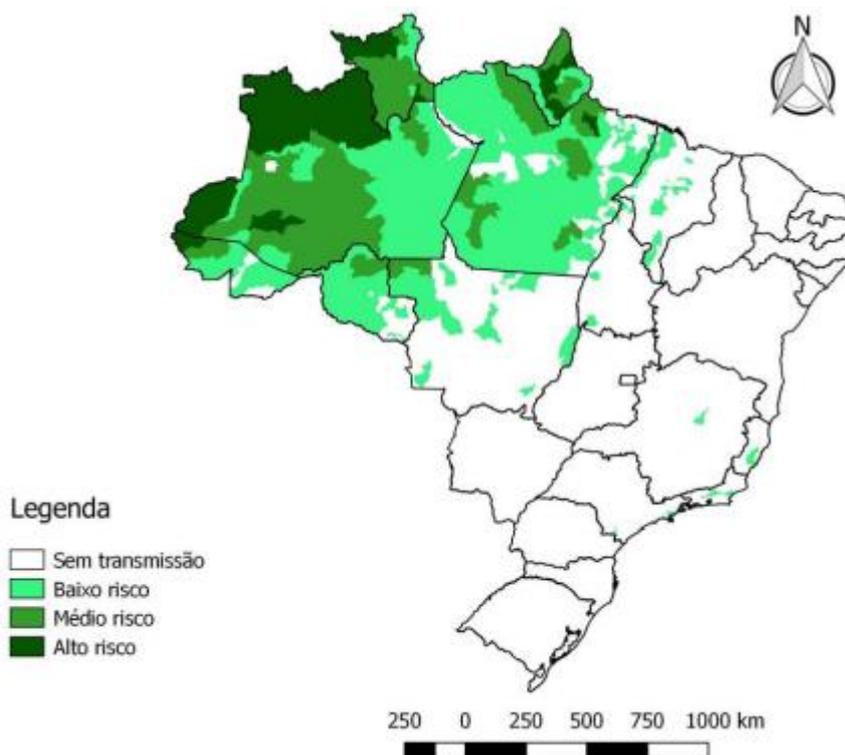


Figura 1 - Distribuição dos casos de malária no Brasil no ano de 2016. A região norte do Brasil é área endêmica para transmissão da malária. Fonte: (BRASIL, 2017).

A malária no Brasil é mediada pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) vinculado ao Ministério da Saúde (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003), cujo o objetivo de diminuir a gravidade e a mortalidade dos casos, promover medidas preventivas para impedir o ciclo da doença em áreas endêmicas e promover a manutenção da ausência da doença em áreas não endêmicas (BRASIL, 2017). O Ministério da Saúde usa o PNCM para inspecionar e proporcionar uma política permanente para prevenção e controle da malária, e ainda, conta com o apoio da rede estruturada do Sistema Único de Saúde (SUS) para atender a todas as regiões do país (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). As redes públicas e privadas de saúde são responsáveis pela notificação compulsória dos casos de malária no Brasil. Na região amazônica, todos os casos suspeitos devem ser notificados às autoridades de saúde, em até 7 dias, através do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária (Sivep-Malária). Ainda, é necessário a inclusão de todos os exames que comprovem o estado de saúde do paciente e o controle de cura (RODRIGUES; NETO, 2011). Na região extra-amazônica, a malária que é uma

doença de notificação compulsória imediata, todo caso suspeito deve ser notificado às autoridades de saúde em até 24 horas. Além disso, a notificação deve ser registrada também no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) e o encerramento do registro da notificação deve ser completado no prazo máximo de 30 dias (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015; MOREIRA BRAZ et al., 2016). Assim, como na região amazônica é necessário registrar também todos os exames de controle de cura. A identificação dos casos suspeitos pode ser por detecção passiva, quando o paciente procurar a unidade de saúde notificante para atendimento, ou por detecção ativa, quando o profissional de saúde desloca-se aos locais de residência, trabalho ou lazer dos indivíduos oferecendo atendimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2017).

1.2 Transmissão da malária

O ciclo de vida do *Plasmodium* é bastante complexo, e possui 2 fases: onde o homem é o hospedeiro intermediário e o mosquito o hospedeiro definitivo. O ciclo de vida do *Plasmodium* (Fig.2) no homem inicia-se quando uma fêmea infectada do mosquito do gênero *Anopheles*, ao realizar o seu repasto sanguíneo introduz esporozoítos infectantes na pele do hospedeiro (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012; MARCHIORI et al., 2013). Na corrente sanguínea, os esporozoítos rapidamente chegam ao fígado e atravessam hepatócitos e células de kuppfer até se estabelecerem em um hepatócito. No interior do hepatócito, os esporozoítos se dividem por esquizogonia, dando origem a milhares de merozoítos, abrigados em vesículas, denominadas merossomas (GOMES et al., 2011). Estas se rompem na corrente sanguínea e liberam os merozoítos, que invadirão os eritrócitos do hospedeiro. Dentro do eritrócito, o *Plasmodium* se desenvolve alimentando-se da hemoglobina formando a hemozoína e sofre novamente esquizogonia, originando milhares de parasitas, que promoveram o rompimento da célula e assim os merozoítos serão capaz de invadir novos eritrócitos (MILLER et al., 2002; PORTUGAL; DRAKESMITH; MOTA, 2011). Após algumas gerações de merozoítos, alguns parasitas não iniciam o processo de divisão celular e diferenciam-se em formas sexuadas, os gametócitos (masculino e feminino) seguirão o seu desenvolvimento apenas ao serem ingeridos pelo inseto vetor, onde no intestino do mosquito *Anopheles* ocorrerá a reprodução sexuada e a diferenciação para produção dos esporozoítos.

Estes migram para a glândula salivar, onde poderão então transmitir o parasita para outras pessoas no momento do repasto sanguíneo (VAN DOOREN et al., 2005).

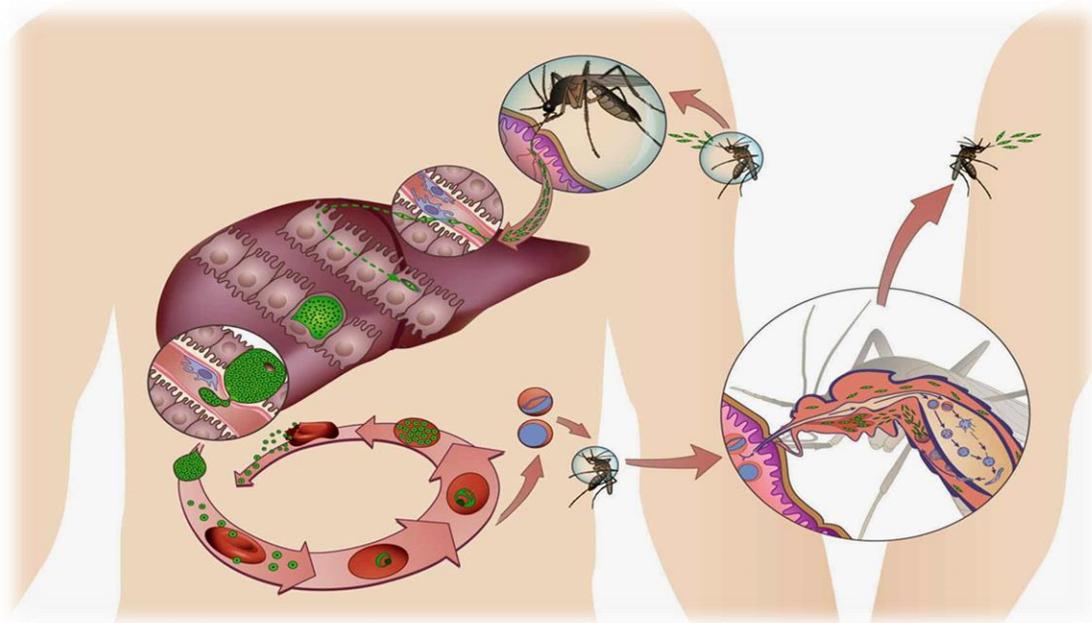


Figura 2 - Ciclo de vida do *Plasmodium* ssp. O ciclo de vida do *Plasmodium* é complexo e inicia-se quando fêmea do mosquito *Anopheles* ao realizar o repasto sanguíneo introduz os esporozoítos na corrente sanguínea, migrando aos hepatócitos onde ocorre um processo de esquizogonia, os merozoítos na corrente sanguínea invadem as hemácias e ocorre um novo processo de esquizogonia. Após o rompimento das hemácias os merozoítos iniciaram um novo ciclo ou se diferenciaram em gametócitos, que seguirão seu desenvolvimento ao serem ingeridos pelo mosquito, que então será o transmissor da doença ao inocular os esporozoítos em um indivíduo saudável. Fonte: (PORTUGAL; DRAKESMITH; MOTA, 2011).

1.3 Diagnóstico Laboratorial da Malária

O padrão ouro no diagnóstico da malária é a detecção microscópica da espécie do *Plasmodium* ssp pela técnica da gota espessa corados com Giemsa, que apresenta baixo custo e é o mais acessível em áreas endêmicas (POLLAK; HOURI-YAFIN; SALPETER, 2017). Entretanto, a microscopia de luz apresenta limitações, como a necessidade de treinamento especializado da equipe de saúde para atuação como microscopista (PRESTEL et al., 2018).

Por isso, os testes rápidos contribuem para o diagnóstico rápido, simples, preciso e econômico e não requerem eletricidade e equipamento específico na identificação da malária (TANGPUKDEE et al., 2009; ESHEL et al., 2017). Existem comercialmente diversos testes imunocromatográficos para identificação da malária

como por exemplo Malar-check™ específico para o *P. falciparum* permitindo a detecção da proteína 2 rica em histidina do inglês “histidine-rich protein 2” (HRP2). Entretanto, sua limitação deve-se ao tempo prolongado da proteína circulante, após a cura do paciente, promovendo um resultado falso positivo (AVILA et al., 2002). Além disso, estudos recentes indicam que algumas cepas de *P. falciparum* podem promover a exclusão do gene (pfrp2 and pfrp3), resultando na ausência da detecção da HRP2 circulante em pacientes infectados (WHO, 2017).

A identificação de infecções mistas pode ser realizada pelo BinaxNOW® (DIMAIO ET AL., 2012) Optimal-IT™ e ICT™ (RUTH et al., 2007), que diferenciam as espécies de *Plasmodium* pela detecção da enzima desidrogenase láctica, e ainda, permite diferenciar a fase aguda e da convalescença (SAÚDE, 2005). A limitação é a identificação entre 100 e 500 parasitas/μL na amostra sanguínea, enquanto, pelas técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase do inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é possível identificar de 1-5 parasitas/μL de sangue (POLLAK; HOURI-YAFIN; SALPETER, 2017).

A PCR tem como objetivo quantificar a expressão do gene 18s rRNA, que utiliza um primer pan-*Plasmodium*, para caracterização de diferentes espécies de *Plasmodium* (LALREMRUATA et al., 2017). A biologia molecular é importante na identificação da malária submicroscópica, pois baixos valores de parasitemia podem não ser diagnosticados através da gota espessa, aumentando a incidência de resultados falsos negativos no diagnóstico e na recrudescência da malária (KATRAK et al., 2018). Além disso, pode ser realizado a sorologia para quantificação dos anticorpos específicos para os estágios sanguíneos, e imunofluorescência que apresenta alta sensibilidade e especificidade na detecção do *Plasmodium* sp (TANGPUKDEE et al., 2009; PRESTEL et al., 2018).

1.4 Tratamento da malária

O protocolo de administração com antimaláricos varia de acordo com a espécie de *Plasmodium* (CRUZ et al., 2013). Os medicamentos antimaláricos podem ser direcionados as diversas fases do ciclo do parasita. Novos fármacos estão sendo desenvolvidos contra esquizontídeos sanguíneos (OZ439 e KAE609), ou bloqueio de transmissão com a destruição de gametócitos (artemisinina), ou ainda evitando a

recrudescência de hipnozoítos em pacientes assintomáticos, tratados com primaquina (tafenoquine) (HEMINGWAY et al., 2016).

Os pacientes infectados por *P. vivax* são tratados com dois principais fármacos a cloroquina (CQ) e, um esquizotocida tecidual, como a primaquina (PQ), para atuar sobre os seus hipnozoítos (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012; PAULA et al., 2016). O tempo de duração total do tratamento são 14 dias para CQ associado com 7 dias para PQ (CRUZ et al., 2013). Entretanto, pacientes com deficiência de G6PD (*Glucose-6-phosphate dehydrogenase*) podem desenvolver anemia hemolítica aguda após tratamento com PQ (HEMINGWAY et al., 2016; DOMBROWSKI et al., 2017).

Para o tratamento de malária por *P. falciparum* recomenda-se a associação de quinina e tetraciclina, ou ainda, no caso de pacientes que não toleram ou apresentam baixa resposta pela resistência do parasita, pode ser utilizado derivados de mefloquina e o artesunato, durante a malária grave (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012; VENTURE, 2013; WHO, 2017).

1.5 As principais complicações durante a malária grave

As principais consequências da malária grave são em decorrência da citoadesão dos eritrócitos infectados pelo plasmódio ao endotélio da microvasculatura dos diferentes tecidos (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018) ou adesão de eritrócitos infectados a eritrócitos não infectados, fenômeno amplamente conhecido como "rosetas" causando obstrução de pequenos vasos, ativação e lesão das células endoteliais, fatores determinantes para a patogenicidade na malária em muitos órgãos (KIRCHGATTER; DEL PORTILLO, 2005; ALENCAR FILHO et al., 2014).

As complicações observadas na malária são acidose metabólica, anemia severa, hemorragia (GOMES et al., 2011), hipoxemia (RANIERI et al., 2012), malária placentária (SHARMA; SHUKLA, 2017), malária cerebral (SINGH, 2018) e desordens pulmonares (ROTTA et al., 2015). Esta última, cada vez mais observada em pacientes ou animais infectados, pode ocasionar a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (ALENCAR FILHO et al., 2014; SERCUNDES et al., 2016).

Diversos receptores do hospedeiro e ligantes do parasita estão envolvidos na citoaderência ao endotélio e na formação de "rosetas", como por exemplo, a proteína

de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum* (PfEMP1). Esta proteína é o principal ligante adesivo dos eritrócitos infectados as células endoteliais que expressão CD36, ICAM-1, VCAM, CD31 e em células placentárias a condroitina sulfato A (KIRCHGATTER; DEL PORTILLO, 2005; CIÊNCIAS; RICARDO; PEREIRA, 2008; PASTERNAK; DZIKOWSKI, 2009; GOMES et al., 2011; LAVSTSEN et al., 2012; DEROOST et al., 2016).

A recrudescência na malária ocorre quando as formas sanguíneas do parasita não são completamente erradicadas após o tratamento. Os principais motivos são a terapêutica deficiente, especialmente devido a não adesão do paciente ao tratamento, a resistência do *Plasmodium* aos fármacos ou baixas doses terapêuticas (SIMÕES et al., 2014). Ocorre com maior frequência no *P. vivax* (WELLS; BURROWS; BAIRD, 2010) devido ao seu ciclo eritrocitário só ocorrer em reticulócitos, as infecções recorrentes são devido à existência dos hipnozoítos, forma latente da fase hepática (PAULA et al., 2016).

Os sintomas da malária manifestam-se somente na fase eritrocítica, durante as sequências de esquizogonia (GOMES et al., 2011; COWMAN et al., 2016). A febre e a anemia são sinais da malária e nesta fase ocorre a formação do pigmento malárico (hemozoína), que é um produto do metabolismo da hemoglobina realizada pelo parasita (OLIVIER et al., 2010). Após a lise eritrocítica, substâncias pirogênicas como as citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) são liberadas pelos macrófagos ativados pelo parasita que promovem o aumento da temperatura corporal pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (VOLTARELLI, 1994). As citocinas inflamatórias promovem a quimiotaxia de neutrófilos e acúmulo no pulmão, sendo um dos mecanismos da lesão endotelial a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos - NETs (do inglês: *neutrophils extracellular traps*) (SERCUNDES et al., 2016). A fisiopatologia durante a SDRA associada a malária é complexa e são necessários mais estudos para melhor compreensão (CÂNDIDO MOURA et al., 2017).

1.6 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo associada a Malária

A SDRA é caracterizada por edema de origem não cardiogênica (ALESSANDRI; PUGLIESE; RANIERI, 2018), inflamação de início agudo e lesão do endotélio alveolar e do parênquima pulmonar, promovendo assim o aumento da

permeabilidade vascular (HOWELL; DAVIS, 2018), infiltrado pulmonar difuso e bilateral, evidente na radiografia de tórax (BALL et al., 2017), falência respiratória aguda, complacência pulmonar reduzida e hipoxemia grave. Todos estes fatores estão descritos nos critérios da definição de Berlin (RANIERI et al., 2012; VIANA, 2015; AMIN; AMANDA, 2017), onde a hipoxemia é classificada em leve quando a relação entre pressão arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio (PaO_2 / FiO_2 de 201 a 300mmHg), moderada (PaO_2 / FiO_2 de 101 a 200mmHg) ou grave ($PaO_2 / FiO_2 \leq 100$ mmHg) (AMATO et al., 2007; MARCHIORI et al., 2013; OCHIAI, 2015; ROSA et al., 2015; FUNDA; CELULAR, 2016; HOWELL; DAVIS, 2018). Os critérios da definição de Berlin (RANIERI et al., 2012) obtiveram algumas modificações como a inclusão da avaliação da pressão expiratória final positiva do inglês “*Positive End-Expiratory Pressure*” (PEEP) com valores mínimos de 5cm H₂O e da técnica de tomografia computadorizada (CT), do inglês “*computed tomography*”, para complementar os resultados da radiografia de tórax (RIVIELLO; BUREGEYA; TWAGIRUMUGABE, ; AMIN; AMANDA, 2017)

Além disso, durante a SDRA observa-se disfunção e aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar pulmonar (ROCH; GUERVILLY; PAPAZIAN, 2011) (Fig.3), formando edema rico em proteínas dentro dos espaços alveolares (GUIDELINES, 2018), onde ocorre a deposição de fibrina e debris celulares, que formam a membrana hialina (FUDALA et al., 2010; VAN DEN STEEN et al., 2013). Ainda, observa-se a redução e a inativação do surfactante que ainda é sintetizada, cuja função é diminuir a tensão superficial alveolar dando estabilidade, de modo que é necessário menor quantidade de pressão para manter os alvéolos abertos (ROTTA et al., 2015). A deficiência de surfactante favorece o colapso alveolar que, associado ao edema, determina importante prejuízo nas trocas gasosas e na mecânica pulmonar (VIANA, 2015; ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018).

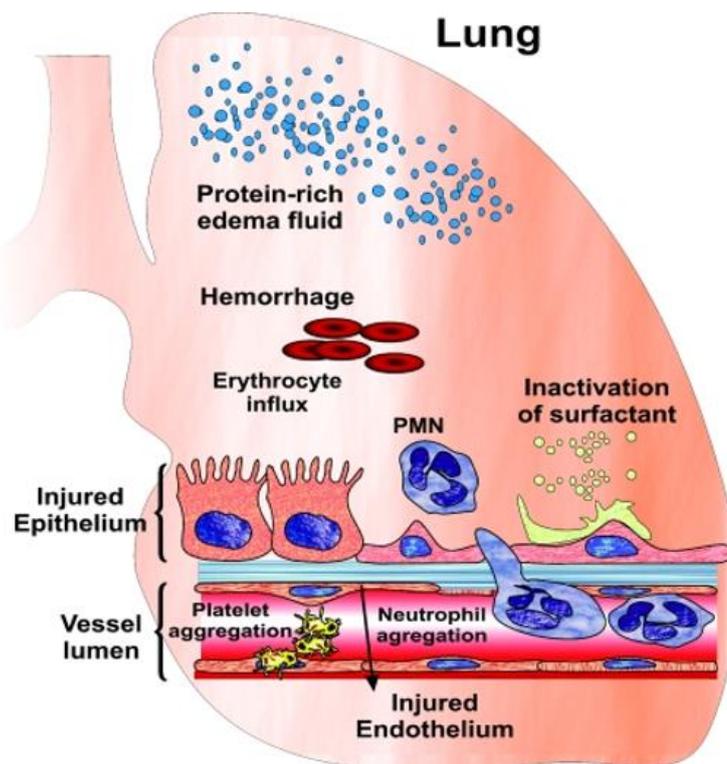


Figura 3 - Representação de alvéolo pulmonar durante a síndrome do desconforto respiratório agudo. A lesão endotelial acarreta no aumento da permeabilidade vascular e influxo de eritrócitos no interior do alvéolo, produzindo a hemorragia, além disso, a resposta inflamatória exacerbada com fagócitos (neutrófilos). O influxo de edema rico em proteínas promove a inativação do surfactante, que a produção pelos pneumócitos do tipo 2 já é insuficiente. Fonte: (FUDALA et al., 2010).

A diminuição da capacidade de trocas gasosas e o aumento de mediadores inflamatórios nos pulmões é um fator que resulta em insuficiência respiratória em pacientes críticos, podendo levá-los ao óbito (COX-SINGH et al., 2010; HAYDOURA et al., 2011).

A identificação da SDRA foi realizada há 51 anos, entretanto, a fisiopatologia que conduz a SDRA associada a malária ainda não estão completamente esclarecidos (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; GUIDELINES, 2018). A mortalidade de pacientes permanece elevada nas unidades de terapia intensiva em média 40% (OCHIAI, 2015; SUMMERS et al., 2016), mesmo após o tratamento antimalárico (VAL et al., 2017) e, ainda não se conhece formas de diagnóstico precoce que permitam um tratamento efetivo e que evite a morte do paciente (ANSTEY et al., 2002; MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008).

1.7 Uso de métodos de diagnóstico por imagem na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

A evolução das técnicas de imagem foram fundamentais para a realização do diagnóstico da SDRA (ZOMPATORI; CICCARESE; FASANO, 2014; VERGANI et al., 2017). Atualmente, é possível além da avaliação anatômica, a mensuração da função pulmonar permitindo a aquisição de imagens dinâmicas em três dimensões (SIMON, 2005).

O Raio-x de tórax (RXT) é a metodologia mais utilizada devido ao baixo custo, e acessibilidade em áreas endêmicas de malária (SALERI et al., 2006), entretanto, esta técnica apresenta baixa sensibilidade na detecção da efusão pleural (<47%) e consolidação alveolar (<75%) (CHIUMELLO et al., 2013). Além disso, à ausência de alterações radiográficas em pacientes sintomáticos e as limitações inerentes a técnica, especialmente em aparelhos portáteis (RODRIGUES; GUERRA; ALVES, 2010; SHEARD; RAO; DEVARAJ, 2012). O RX apesar da baixa sensibilidade e especificidade durante a fase aguda da SDRA, é eficiente na fase mais tardia (8-14 dias), onde é possível observar o infiltrado bilateral difuso e a opacificação (SHEARD; RAO; DEVARAJ, 2012; BALL et al., 2017).

A investigação por imagem dos pulmões mudou completamente durante a última década, com a evolução das técnicas de imagem pela tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) (OBADINA; TORREALBA; KANNE, 2013), tomografia de impedância elétrica (FRERICHS et al., 2010) tomografia computadorizada por emissão de fóton único do inglês “*Single Photon Emission Computed Tomography*” (SPECT) (KHALIL et al., 2011), tomografia por emissão pósitrons do inglês “*Positron Emission Tomography*” (PET) (JACENE; COHADE; WAHL, 2004) ultrassonografia (BELLO; BLANCO, 2018) e ressonância magnética (KOBAYASHI et al., 2015). Estas técnicas de imagem possibilitam exames com menor duração de tempo, cortes mais finos e uma resolução mais alta, sem perda da qualidade de imagem (MARKSTALLER et al., 2001; OVAS et al., 2001; BELLANI; MAURI; PESENTI, 2012).

Os custos dos exames de imagens variam de acordo com a metodologia empregada sendo que os ensaios de medicina nuclear são os mais caros devido a utilização de moléculas radioativas e estrutura física necessária do setor radiológico (DIMASTROMATTEO; CHARLES; LAUBACH, 2018).

A tomografia computadorizada convencional (CT) é amplamente utilizada no diagnóstico clínico (DE MATOS; BARBAS, 2011) e apresenta muitas vantagens como a obtenção de centenas de projeções pulmonares, ausência de sobreposição de diferentes estruturas e acurácia na mensuração das lesões pulmonares na fase aguda (<7dias), além da avaliação do prognóstico da SDRA (PESENTI et al., 2001; SHEARD; RAO; DEVARAJ, 2012). Atualmente, a CT é padrão ouro na identificação da SDRA (MA et al., 2016). As imagens das alterações pulmonares observadas pela CT são mais de 100 vezes superiores àquelas obtidas por radiologia convencional (MARCHIORI et al., 2005; SILVA et al., 2010).

As lesões pulmonares predominantes durante a fase aguda da SDRA são intensas áreas com atenuação de consolidação (edema) e atenuação de vidro fosco (colapso alveolar) em regiões pulmonares não dependentes. Já na fase tardia (mais que 15dias) podemos observar intensas áreas com atenuação de reticulação (GATTINONI et al., 2001; DE MATOS; BARBAS, 2011; SHEARD; RAO; DEVARAJ, 2012; OBADINA; TORREALBA; KANNE, 2013). As análises qualitativas por CT são complexas pois necessitam de radiologistas/imagenologistas para confirmação e classificação das lesões (JR; NETO, 2002; MARCHIORI et al., 2005; PRESIDENT; VICE-PRESIDENT, 2005; SILVA et al., 2010). As terminologias específicas em CT estão descritas no Anexo 1.

A CT tem sido empregada em diversos modelos experimentais para análise de inflamação e isquemia cerebral (SZIGETI et al., 2015), enfisema pulmonar induzida pelo cigarro (SASAKI et al., 2015) e câncer de pulmão (DAVISON et al., 2013). Além disso, a CT foi utilizada em camundongos com SDRA e identificou, além de infiltrados bilaterais e irregulares, a presença de edema pulmonar (VOELKER et al., 2014).

A análise quantitativa da CT é realizada pela avaliação da aeração pulmonar e as densidades são calculadas a partir das Unidades de Hounsfield (HU) que é a escala de cinza da radiologia (GATTINONI L et al., 1986; SIMON, 2005). Esta unidade tem este nome em homenagem a Godfrey Hounsfield, que foi pioneiro na construção do primeiro aparelho de CT (HOUNSFIELD G.N, 1973; FALLIS, 2013).

A atenuação do raio-x é expressa por HU sendo obtido, em qualquer dado de voxel, que é determinado pela porcentagem de radiação absorvida pelo volume pulmonar. Esta medida indica que quanto maior a absorção, menor a quantidade de radiação atinge o detector de CT (HOUNSFIELD G.N, 1973).

A densitovolumetria é dada pelo coeficiente de atenuação da água, que é o ponto zero das unidades de Hounsfield (0 HU) (VIEIRA SRR, 1999). A densidade do ar representa o ponto menos mil (-1.000 HU) sem absorção de raio-x; a gordura, os músculos e tecidos moles tem densidade próxima de -100 HU; a água e o sangue tem densidade entre zero e 100 HU; os ossos têm densidade superior que 100 HU, podendo chegar até 1.000 HU absorção completa de raio-x (SIMON, 2005; RESKE et al., 2011; MOCELIN et al., 2016).

Já os pulmões são compostos essencialmente por dois tipos de densidade: ar e parênquima pulmonar, diferentes “*thresholds*” são utilizados na mensuração da aeração durante a SDRA (KARMRODT et al., 2006). Os pontos de corte para avaliar a aeração pulmonar são divergentes entre os estudos, o que dificulta a discussão e a comparação dos dados (GATTINONI et al., 2001; MARKSTALLER et al., 2001, 2003).

Entretanto, neste estudo consideramos que os tecidos hiperinflados são compostos basicamente por ar, com valores entre (-1.000 até -900HU); os tecidos normalmente aerados (-900 até -500HU) são compostos por alta quantidade de ar e parênquima, considerados com ventilação e perfusão normais; quando o tecido apresenta baixa quantidade de ar é denominado pobremente aerado (-500 até -100HU), que corresponde com a presença de atenuação de vidro fosco e finalmente, os tecidos não aerados (-100 até 100HU) são caracterizados pela ausência ar e intensas áreas de atenuação de consolidação (edema) demonstrando a atelectasia pela baixa perfusão pulmonar (ROUBY et al., 2003; RESKE et al., 2011; WOLF et al., 2015; PESENTI et al., 2016; VERGANI et al., 2017; CHIUMELLO et al., 2018).

A aferição de densidade tomográfica pode ser convertida diretamente em que quantidade de ar e de tecidos existente em determinada região de interesse (ROI) das imagens pulmonares. Por exemplo, uma região do pulmão que tenha uma densidade de -600 HU contém uma média de 60% de ar e 40% de parênquima (IRION et al., 2007; HOCHHEGGER et al., 2010; FALLIS, 2013). Portanto, a densitovolumetria pulmonar tridimensional vem sendo investigada como uma alternativa mais objetiva e reprodutível no diagnóstico clínico (IRION et al., 2007).

As técnicas de medicina nuclear são essenciais para a visualização de respostas fisiológicas, estudo funcional e mecânico do pulmão (CONWAY, 2012; PESENTI et al., 2016). Entretanto, para a realização dos ensaios é necessário o uso de radiofármacos, compostos sem ação farmacológica cuja composição há um

radionuclídeo, que são marcadores teciduais e podem ser aplicados para o diagnóstico e terapia de várias doenças (OLIVEIRA et al., 2006; AKBAR et al., 2016). Para o diagnóstico, os radiofármacos devem apresentar em sua composição radionuclídeos emissores de radiação gama ou emissores de pósitrons (β^+) (KHALIL et al., 2011), já que o decaimento destes radionuclídeos dá origem a radiação eletromagnética penetrante, que consegue atravessar os tecidos e ser detectada externamente (OLIVEIRA et al., 2006).

Existem dois métodos tomográficos para aquisição de imagens em Medicina Nuclear: o SPECT que utiliza radionuclídeos emissores gama (Tc^{99} , I^{123} , Ga^{67} , Tl^{201}) e o PET que usa radionuclídeos emissores de pósitrons (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F) (JACENE; COHADE; WAHL, 2004; ROACH et al., 2010; CONWAY, 2012). As diferenças entre as técnicas é a melhor resolução da imagem pela PET. Entretanto, os radiofármacos β^+ apresentam meia vida muito baixa com decaimento em minutos, enquanto a maioria dos emissores gama apresentam meia vida de horas. Por isso, os emissores gama são amplamente utilizados no diagnóstico devido à dificuldade na realização do exame devido ao tempo e aquisição dos emissores β^+ (OLIVEIRA et al., 2006; KASHEFI; KUO; SHELTON, 2011).

Os estudos de perfusão (GUERRERO et al., 2007) e ventilação pulmonar (JOGI et al., 2010) são importantes para avaliar a função pulmonar e determinar o fluxo sanguíneo disponível para as trocas gasosas (BAJC; JONSON, 2011; JOBSE et al., 2013). O macroagregado de albumina (MAA) e ácido pentacético (DTPA) são radiofármaco com afinidade pelo pulmão empregados no diagnóstico clínico na medicina nuclear (AKBAR et al., 2016; KNISS et al., 2017). O principal radionuclídeo que é conjugado aos radiofármaco com finalidade diagnóstica é o Tecnécio 99 metaestável (^{99m}Tc) (SCHWOCHAU, 1994), que é um emissor de radiação gama de baixa energia (140keV), apresenta baixo custo e $\frac{1}{2}$ vida de aproximadamente 6,02h, o que possibilita aquisição de imagens cintilográficas de alta resolução em câmeras gamma (ISITMAN et al., 1988; KHALIL et al., 2011; CONWAY, 2012; AKBAR et al., 2016).

O SPECT/CT foi adaptado em pesquisa envolvendo pequenos animais, e servem como um ensaio pré-clínico, uma importante ponte entre a pesquisa básica e prática clínica (HALLER et al., 2008; RODRIGUES; GUERRA; ALVES, 2010). Além disso, são necessários mais estudos pela SPECT/CT durante a SDRA associada a

malária para melhor compreensão da patogênese da doença e diagnóstico precoce do aumento da permeabilidade vascular.

1.8 A permeabilidade vascular pulmonar na SDRA e os modelos experimentais para o estudo da malária

O aumento da permeabilidade vascular pulmonar é um marco da fisiopatologia da SDRA observada tanto em seres humanos como em modelos murinos (GOODMAN et al., 2003; KONRAD et al., 2016). Recentemente, muitos grupos de pesquisa descreveram diversos modelos experimentais para aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos celulares e moleculares da doença e testar possíveis intervenções e tratamentos para SDRA associada à malária (VAN DEN STEEN et al., 2013; ORTOLAN et al., 2014; AEFNER; BOLON; DAVIS, 2015).

Diferentes espécies de *Plasmodium* como *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* e *P. vinckei* são capazes de infectar os roedores, e, portanto, são amplamente utilizados como modelos experimentais para mimetizar a malária humana, pois as espécies capazes de infectar humanos não infectam os roedores (ACHTMAN et al., 2003; SOULARD et al., 2007; VAN DEN STEEN et al., 2010, 2013; HEE et al., 2011; DEROOST et al., 2016; SERCUNDES et al., 2016).

Muitas combinações entre essas espécies de *Plasmodium* sp. e linhagens de camundongos, tais como, C57Bl/6, BALB/c e DBA/2 permitem a compreensão de diversos mecanismos da patogênese da malária grave (EPIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014). Existem na literatura alguns modelos murinos que já foram propostos para estudos da SDRA associada à malária (VAN DEN STEEN et al., 2013). Recentemente, descreveram um modelo utilizando o *Plasmodium yoelii* XL em camundongos BALB/c e identificaram edema pulmonar e altos níveis de parasitemia >90% (FU et al., 2012). O modelo experimental, utilizando a combinação entre o parasita *P. berghei* NK65 e camundongos da linhagem C57Bl/6, observamos o aumento do peso dos pulmões, efusão pleural e a formação de membrana hialina (VAN DEN STEEN et al., 2010). A associação entre o parasita *P. berghei* K173 e camundongos da linhagem C57Bl/6, promoveram comprometimento pulmonar leve, onde os camundongos demonstraram efusão pleural, congestão dos capilares com eritrócitos e presença de leucócitos nos pulmões (HEE et al., 2011). A infecção de camundongos da C57Bl/6 com *P. berghei* ANKA pode gerar o desenvolvimento da

SDRA, porém, este modelo experimental já é estabelecido e muito bem delineado, para estudos sobre os mecanismos da patogênese da malária cerebral (SOUZA et al., 2013; FREEMAN et al., 2016).

Nosso laboratório descreveu um modelo experimental preditivo para o estudo da SDRA associada à malária onde demonstramos que, em média, 50% dos camundongos machos da linhagem DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA apresentam hipóxia grave, infiltrado inflamatório, edema e membrana hialina nos pulmões, além de opacidade torácica observada por exames radiográficos (ORTOLAN et al., 2014). Os achados anatomopatológicos e histopatológicos evidenciaram que a presença de efusão pleural e o aumento da permeabilidade vascular pulmonar, associados ao edema e às hemorragias alveolares graves, que culminaram na morte dos camundongos por insuficiência respiratória. Entretanto, os camundongos que não desenvolvem a SDRA apresentam um quadro de hiperparasitemia (HP) caracterizado pela anemia severa e contagem alta de eritrócitos parasitados no sangue periférico e a ausência de efusão pleural (EPIPHANIO et al., 2010; AITKEN et al., 2014; ORTOLAN et al., 2014; PEREIRA et al., 2016; SERCUNDES et al., 2016). Para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no aumento da permeabilidade vascular é importante a utilização dos estudos *in vitro* com células endoteliais estimuladas com o *Plasmodium*, para avaliar o envolvimento das proteínas constituintes nas junções interendoteliais neste mecanismo (SUSOMBOON et al., 2006; GILLRIE et al., 2007, 2012).

1.9 O papel das células endoteliais e das junções interendoteliais no controle da permeabilidade vascular

As células endoteliais pulmonares consistem em uma barreira celular semipermeável entre o compartimento vascular e o interstício, constituindo uma monocamada de células que recobrem os vasos sanguíneos (GIANNOTTA; TRANI; DEJANA, 2013; SUKRITI et al., 2015).

As células endoteliais (CEs) expressam de forma constitutiva o óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), molécula essencial para promoção da angiogênese, que estimulado pelo VEGF, induzem a produção de óxido nítrico (SUZUKI et al., 2016). O fator de von Willebrand (vWF) é uma glicoproteína que possui a função de mediar a adesão plaquetária nos locais de lesão vascular, levando à ativação da GPIIb-IIIa e,

consequente, agregação plaquetária (BARBOSA; CUNHA; BARBOSA, 2007). Ainda, a molécula de adesão celular endotelial plaquetária (CD31) atua como mediador na passagem de leucócitos entre as células endoteliais, conhecida diapedese ou transmigração (UNGER et al., 2002). Ainda, as CEs expressam a enzima conversora de angiotensina (ACE), que é uma importante proteína na sinalização endotelial e remodelamento vascular (KOHLESTEDT et al., 2004). A Lectina *Ulex europaeus* (UlexI) são glicoproteínas, de origem não-imunológica, que se ligam especificamente a carboidratos (L-fucose) presentes em células endoteliais e podem ser utilizadas na purificação de culturas de células endoteliais da microvasculatura de diversos tecidos (JACKSON et al., 1990). A E-selectina ou CD62E é expressa no endotélio de forma transitória e tem a função de ligante para a migração dos leucócitos após estímulos como por exemplo: LPS, onde ocorre o pico de expressão em até 6 horas (DIXON et al., 2004).

Uma das funções das células endoteliais é delimitar compartimentos teciduais regulando a permeabilidade vascular que é importante para manter a homeostasia pulmonar (CHIBA et al., 2008; TADDEI et al., 2008).

As junções interendoteliais são definidas como especializações da membrana plasmática que interconectam células vizinhas dentro de um tecido (LAMPUGNANI; DEJANA, 1997). As junções comunicam-se com o citoesqueleto (filamentos de actina) através de moléculas adaptadoras: zônula de oclusão 1, 2, 3 (ZO-1, ZO-2, ZO-3) (THEVENIN et al., 2013). As junções interendoteliais são divididas em categorias de acordo com suas funções: junções de oclusão (ou oclusivas), de adesão (ou aderentes) e comunicante (LAMPUGNANI; DEJANA, 1997; DEJANA; SPAGNUOLO; BAZZONI, 2001; BAZZONI; DEJANA, 2004; ZIHNI et al., 2016a; KOMAROVA et al., 2017).

1.10 O estudo da junção de oclusão no aumento da permeabilidade vascular pulmonar

As junções de oclusão (JO) (Fig. 4) são proteínas expressas nas células endoteliais e epiteliais que possuem a função de barreira seletiva e delimitação dos compartimentos (GUNZEL; YU, 2013), uma vez que por difusão paracelular controla a passagem de solutos e íons de uma célula para outra, participando da manutenção da homeostasia (WACHTEL et al., 1999) e, também formam a fronteira entre os

domínios apical e basolateral da membrana plasmática e estão ligadas à maquinaria que controla a polaridade (SUZUKI et al., 2016; ZIHNI et al., 2016a). Estudos recentes identificaram uma grande variedade de componentes que estão associados as junções de oclusão, o que tem desafiado o tradicional modelo, em que junções de oclusão eram consideradas como barreiras de difusão simples formadas por um complexo molecular rígido (ZIHNI et al., 2016a).

As proteínas presentes neste grupo são ocludinas (OCL), claudinas (CLDN), moléculas de adesão juncional (JAM), proteínas adaptadores e intracelulares de zônulas de oclusão 1, 2, 3 (ZO-1, ZO-2, ZO-3) (DEJANA; SPAGNUOLO; BAZZONI, 2001; BAZZONI; DEJANA, 2004; CHIBA et al., 2008). Estas proteínas desempenham um importante papel na integridade da barreira endotelial pulmonar, regulam a sinalização intracelular e a organização do citoesqueleto foi identificado que a diminuição da expressão ocasiona no aumento da permeabilidade vascular e do edema pulmonar (FURUSE et al., 1993b; D'ATRI; CITI, 2001; DEJANA; SPAGNUOLO; BAZZONI, 2001; LIU; GU; WANG, 2014).

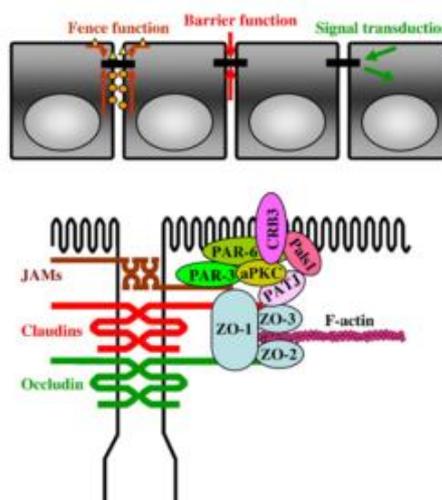


Figura 4 – Esquema da função e localização da junção de oclusão na célula endotelial. As junções de oclusão estão na região apical da membrana plasmática com predominância na membrana plasmática e são responsáveis por promover o controle seletivo de substâncias. As funções da junção de oclusão são: impedir a livre passagem de substâncias paracelular e realizar a transdução de sinal. Fonte: (CHIBA et al., 2008).

A ocludina (OCL), uma fosfoproteína com massa molecular de aproximadamente 60 kDa, (Fig.5) possui quatro regiões hidrofóbicas inseridas na

membrana plasmática, dois domínios extracelulares ricos em resíduos de glicina e tirosina e dois denominados intracelulares domínios N e C terminal citoplasmáticos constituídos de resíduos de serina, treonina e tirosina (FURUSE et al., 1993a; CHIBA et al., 2008). Além disso, a região C terminal da OCL voltada para o citoplasma fornece a conexão da OCL com o citoesqueleto, assegurando a alta resistência elétrica das monocamadas das células endoteliais e diminuição da permeabilidade paracelular (WITTCHEN; HASKINS; STEVENSON, 1999). Essa característica não é vista em outras proteínas de membranas, que necessitam da mediação de uma proteína adaptadora para se associarem a actina. Além disso, a OCL é capaz de ligar-se a ZO1, ZO2 e ZO3 através do domínio GUK (ZIHNI et al., 2016a).

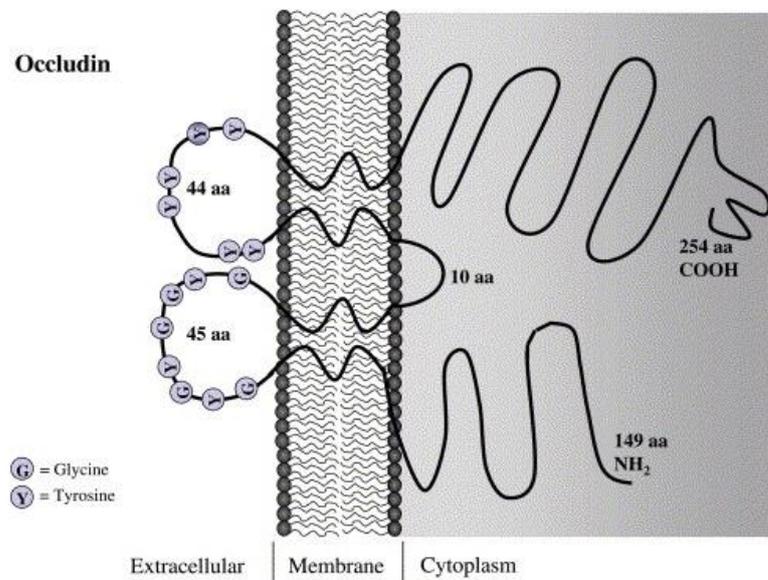


Figura 5 - Representação esquemática da estrutura da ocludina. A ocludina é altamente expressa na membrana plasmática das células endoteliais e apresenta 4 domínios trans membranares e 2 domínios extracelulares e intracelulares. Fonte: (FELDMAN; MULLIN; RYAN, 2005).

A OCL apresenta a capacidade de formar estruturas similares aos da JO promovendo a formação da monocamada justaposta, quando transfectadas em células que não apresentam JO (FURUSE et al., 1998), a superexpressão de formas mutantes de ocludina em células epiteliais levam a mudanças nas funções de barreira e aumento de permeabilidade na JO (BAMFORTH et al., 1999). OCL altamente fosforilada encontram-se na JO, enquanto que as não ou são pouco fosforilada se localizam no citoplasma (ANDREEVA et al., 2001). A abundância da OCL está relacionada com o grau de fechamento do endotélio, sendo esta proteína fundamental

na polarização celular, visto que estudos utilizando camundongos OCL-KO identificaram falhas na função de barreira em diferentes tecidos, demonstrando o papel crucial desta proteína para homeostasia da permeabilidade vascular (FURUSE et al., 1993a; WACHTEL et al., 1999; CHIBA et al., 2008).

A família das claudinas (CLDN) são caracterizadas por um grupo com 27 proteínas de superfície de membrana com aproximadamente 18-27 kDA, constituídas com 4 domínios membranares e 2 loops extracelulares e um domínio C terminal citoplasmático, sem sequências similares a OCL (CHIBA et al., 2008; GUNZEL; YU, 2013). Os últimos aminoácidos do domínio C terminal são altamente conservados sendo capazes de se ligar ao domínio PDZ (CHIBA et al., 2008; LEE; ZHENG, 2010). Através das regiões PDZ, a claudina é capaz de se ligar as proteínas adaptadores ZO1, ZO2 e ZO3 (ITOH et al., 1999). As moléculas de um membro da família CLDN (Fig. 6) podem ligar-se entre si por interação homofílica (CLDN1 com CLDN1) ou por interação heterofílica (CLDN1 com moléculas de outros membros da família como CLDN3). As CLDNs podem realizar interação cis (CLDN1 pode interagir ao longo da membrana plasmática da mesma célula) ou ainda, interação trans, quando interagem com a membrana da célula vizinha (CLDN1 com CLDN3) (KRAUSE et al., 2008).

A CLDN apresenta uma distribuição distinta em diferentes tecidos, indicando que elas seriam as responsáveis pela ampla variedade na resistência elétrica e seletividade iônica paracelular encontradas no endotélio (ITALLIE; RAHNER; ANDERSON, 2001). Essa expressão diferenciada das claudinas parece estar relacionado com o desenvolvimento, evidenciado pela CLDN6 que está presente no epitélio embrionário de camundongos, mas a sua superexpressão em ratos transgênicos gera o aumento na permeabilidade da epiderme (K.; TURKSEN; TROY, 2002). Já camundongos CLDN1-KO tem a barreira epidérmica comprometida, levando a desidratação e morte em menos de 1 dia de vida (FURUSE et al., 2002). A CLDN5 é predominante no endotélio pulmonar e camundongos CLDN5-KO têm a barreira pulmonar comprometida e vão ao óbito nas primeiras 10 horas de vida, demonstrando a importância fundamental desta proteína para a homeostasia pulmonar (GUNZEL; YU, 2013). Em células endoteliais a fosforilação da CLDN5 é induzida pela cAMP através da treonina 207 pela via dependente de PKA, induzindo a translocação da proteína para o citoplasma e diminuindo a barreira paracelular (CHIBA et al., 2008; INAMURA et al., 2013).

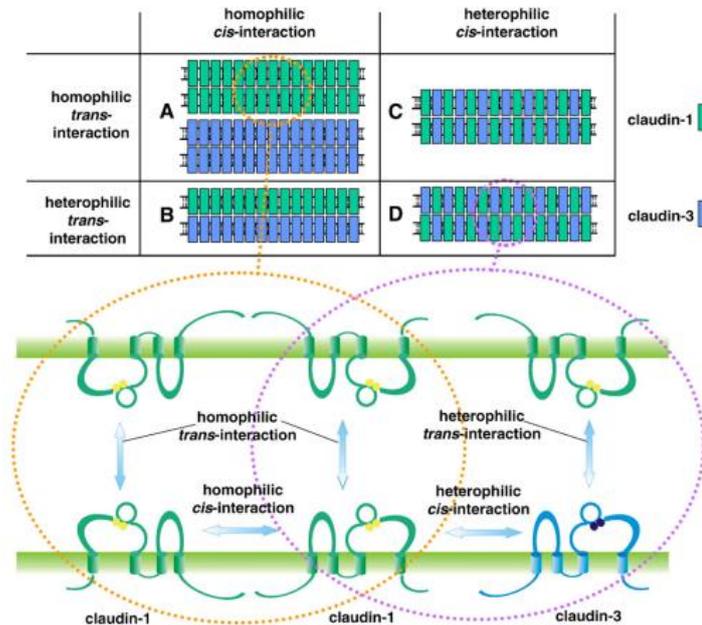


Figura 6 – Representação esquemática das interações moleculares da Claudina entre as células. As interações entre os membros das CLDN são homogêneas e a mesma proteína pode se ligar na mesma membrana (interação cis) ou na célula vizinha (interação trans), ainda pode se ligar na membrana da célula (interação homofílica) ou uma proteína pode se ligar a proteína diferente na célula vizinha (interação heterofílica). Fonte: (KRAUSE et al., 2008).

As proteínas adaptadoras da família zônula de oclusão (ZO) são caracterizadas por um grupo de 3 proteínas (ZO-1, ZO2 e ZO-3) com aproximadamente 220kDA, sendo que, a ZO-1 é a isoforma predominante (ZIHNI et al., 2016a) apresenta múltiplos domínios PDZ (Fig. 7), que promove a interação das proteínas das JO na ZO-1, integrando a JO aos filamentos de actina do citoesqueleto (FANNING et al., 1998; ITOH et al., 1999). Acredita-se que as moléculas da ZO estabelecem uma comunicação entre o núcleo e as junção de oclusão, balanceando a diferenciação e crescimento das células epiteliais e endoteliais (RAO et al., 2002).

Os domínios PDZ são indispensáveis para o agregamento e o ancoramento de proteínas trans membranares (Fig.7), regulação do crescimento e da sobrevivência celulares (BAZZONI; DEJANA, 2004; YAMAZAKI et al., 2008; LEE; ZHENG, 2010). A ZO-1 associa-se pelo primeiro domínio PDZ1 na região C terminal a CLDN (ITOH et al., 1999) e se liga pelo PDZ2 à ZO-2, pelo PDZ3 à molécula de adesão juncional (JAM) e através do domínio GUK à OCL. Além disso, o domínio C terminal é capaz de integrar aos filamentos de actina do citoesqueleto (FANNING et al., 1998; EBNET

et al., 2000; BAZZONI; DEJANA, 2004). A via de MAPK regula a fosforilação da tirosina de ZO-1 e, o aumento do estresse oxidativo promove a degradação do complexo da zônula de oclusão diminuindo a função de barreira da JO (FANNING et al., 1998; RAO et al., 2002).

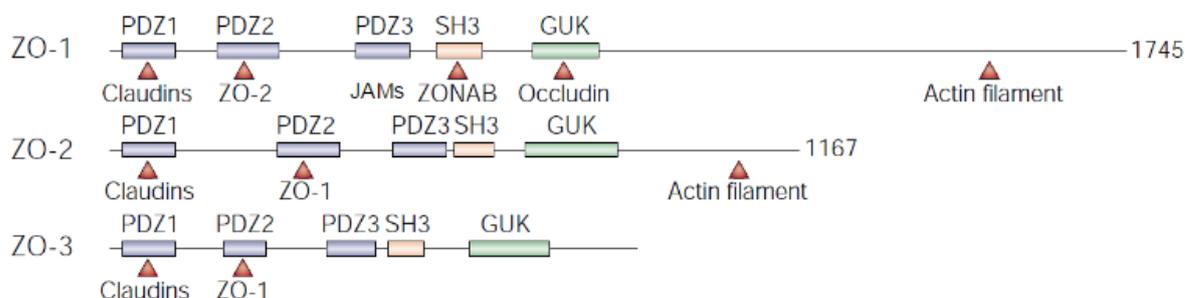


Figura 7- Representação esquemática do modelo de interação da zônula de oclusão as proteínas da junção de oclusão e filamentos de actina do citoesqueleto. A ZO-1 interage através do domínio PDZ com a claudina, ZO-2 e JAM e pelo domínio SH3 com ZONAB, que regula o ciclo celular. ZO-2 interage com a claudina pelo PDZ1, e com a ocludina pelo domínio GUK. Já a ZO-3 liga-se, pelo seu primeiro PDZ, à claudina, pelo PDZ2 à ZO-1 e pelo domínio GUK a ocludina. Todas as proteínas do complexo da zônula de oclusão ligam-se aos filamentos de actina. Fonte: (TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001)

1.11 O papel das junções de adesão na permeabilidade vascular pulmonar

As junções aderentes (Fig.8) são glicoproteínas expressas membrana plasmática, sendo compostas por uma região extracelular, um domínio transmembrânico e uma pequena cauda citoplasmática (CHIBA et al., 2008; NORIA et al., 2016), que promovem a adesão entre as células e entre a célula e a matrix extracelular (ZIHNI et al., 2016b). A molécula de adesão juncional (JAM) é um grupo composto por 3 isoformas JAM-A, JAM-B ou JAM de endotélio vascular (VE-JAM) e JAM-C, com peso molecular de aproximadamente 40kDa (DEJANA; SPAGNUOLO; BAZZONI, 2001). A JAM é um membro da família da imunoglobulinas sendo expressa em leucócitos, plaquetas, células endoteliais e epiteliais, tem como função a integração célula-célula JAM-A com JAM-A ou JAM-B dependendo da célula, sendo fundamentais para o controle da permeabilidade vascular endotelial (CHIBA et al., 2008). A caderina vascular endotelial (VE-caderina) possui o peso molecular de aproximadamente 140kDA, é constituída por complexos de proteínas da região citoplasmática que se associam às proteínas ligadas a actina (DEJANA; ORSENIGO; LAMPUGNANI, 2008), tais como α -catenina, vinculina, α -actina e epiplina, promovendo uma forte adesão célula-célula, mediando às interações laterais

intracelulares e intercelulares (DEJANA; BAZZONI; LAMPUGNANI, 1999; DEJANA; SPAGNUOLO; BAZZONI, 2001; VINCENT et al., 2004).

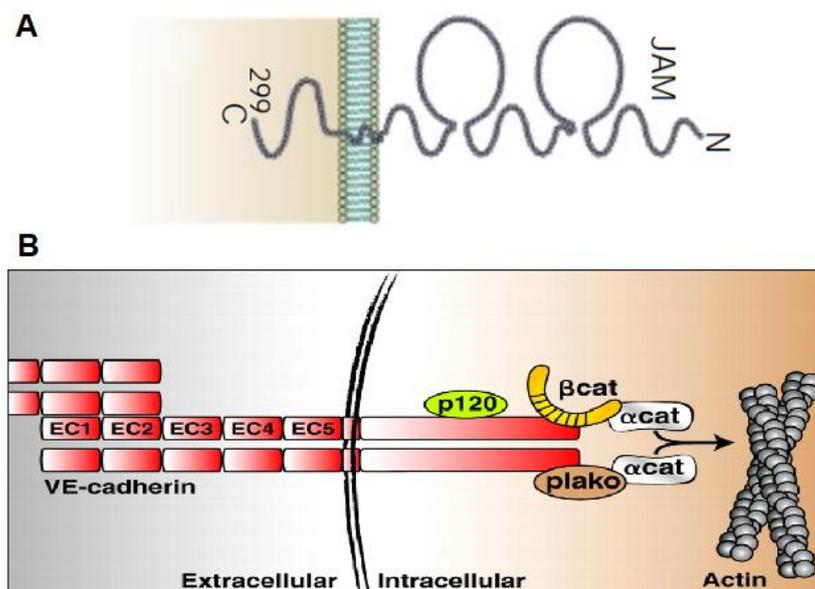


Figura 8 – Representação esquemática da estrutura da JAM e VE-caderina. A) A molécula de adesão juncional (JAM) apresenta em sua estrutura um domínio de membrana, um domínio C terminal citoplasmático e um segmento extracelular. B) A VE-caderina é representada como um dímero, que é a unidade funcional mínima das caderinas e apresenta 5 segmentos extracelulares EC1-EC5 que promove o agrupamento da VE-caderina para a interação célula-célula. As proteínas bem conhecidas por interagir com a VE-caderina incluem as proteínas cateninas p120, β-catenina (βcat) e plakoglobina (plako). β-catenina e plakoglobina associam diretamente com VE-caderina e α-catenina (αcat) promovendo a ligação ao citoesqueleto. Fonte: (DEJANA; ORSENIGO; LAMPUGNANI, 2008; TADDEI et al., 2008)

1.12 O papel da junção comunicante na permeabilidade vascular pulmonar

As junções comunicantes (JC), formadas pelo grupo de proteínas denominadas conexinas (Cx), são regiões especializadas da membrana celular que intermediam a comunicação entre as células (SÖHL; WILLECKE, 2004; ZHANG, 2010). Existem mais de 40 tipos de Cx, responsáveis pela passagem de moléculas de até 1,5 kDa pelos poros formados (fendas estreitas e constantes de 2-4 nm de espessura), tais como íons, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, sendo capaz de se ligar de forma homofílica e heterofílica (Fig.9) a outras proteínas da JC (MEŞE; RICHARD; WHITE, 2007; FALK; KELLS; BERTHOUD, 2014). A Cx43 apresenta peso molecular

de 43 kDA sendo predominante no endotélio pulmonar e fundamental para manter a integridade vascular do pulmão (SÖHL; WILLECKE, 2004; THEVENIN et al., 2013; KOMAROVA et al., 2017)

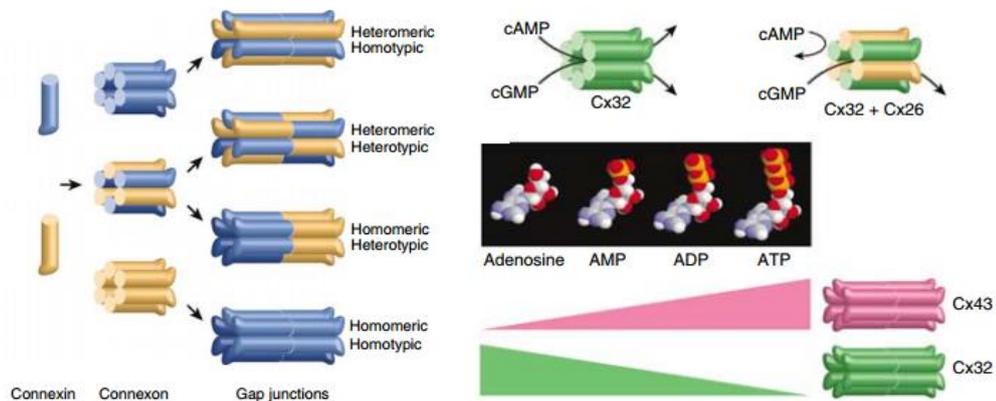


Figura 9 - Representação da estrutura e da função da junção comunicante. As junções comunicantes, em inglês *Gap junctions*, são um conjunto de canais com proteínas da família das conexinas, podendo interagir de forma homofílica e heterofílica, que formam túneis de conectividade entre as células e atuam na permeabilidade seletiva de solutos, a cAMP e cGMP controlam a seletividade de carga dos hemicanais. Os hemicanais da Cx32 foram mais permeáveis à adenosina do que os canais formados pela Cx43. No entanto, os hemicanais Cx43 apresentaram permeabilidade progressivamente maior a AMP, ADP e ATP do que aqueles formados por Cx32, e portanto, existem diferenças na seletividade da comunicação dependendo da proteína da junção comunicante. Fonte: (MEŞE; RICHARD; WHITE, 2007).

Os mecanismos envolvidos na patogênese da SDRa associada à malária são pouco compreendidos, portanto, nosso propósito é propor a aplicação da imagenologia como ferramenta para o diagnóstico precoce e entender as alterações das junções das células endoteliais e, conseqüentemente, a modificação na permeabilidade vascular pulmonar.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é propor o diagnóstico precoce por imagem no desenvolvimento da SDRA associado à malária em modelo experimental e compreender o aumento da permeabilidade vascular pulmonar por meio da avaliação das junções interendoteliais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Identificar a aeração pulmonar no modelo experimental de SDRA associada a malária por meio da técnica de tomografia computadorizada (CT);
- II. Avaliar a perfusão pulmonar com o radiofármaco macroagregado de albumina conjugado com tecnécio 99 (^{99m}Tc-MAA) em camundongos DBA/2 após infecção com *Plasmodium berghei* ANKA por meio de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT);
- III. Avaliar a abertura das junções interendoteliais e o aumento da permeabilidade vascular em monocamada de CEPP-DBA/2 após contato direto e indireto com eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA;
- IV. Determinar os tipos de junções interendoteliais (aderentes, oclusivas e comunicantes) envolvidas no aumento da permeabilidade vascular em células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2, após o contato com eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem DBA/2, machos, adultos (6-8 semanas de idade). Para a realização dos experimentos *in vitro*, os animais foram eutanasiados com o uso da associação anestésica Cetamina (150mg/Kg) e xilazina (15mg/Kg), para a coleta dos pulmões (isolamento das células endoteliais pulmonares) e para extração de eritrócitos parasitados. Os eritrócitos não parasitados foram coletados por punção da veia submandibular.

Nos experimentos *in vivo* (SPECT/CT), os camundongos foram anestesiados com concentrações de Cetamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) diluído em solução salina isotônica (PBS).

A maioria dos camundongos foi criado e mantida no Biotério da Parasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP), entretanto, para experimentos *in vitro*, também se utilizou camundongos DBA/2 recém-importados da Jackson Laboratory, reproduzidos no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química Experimental (FCF-IQ/USP).

3.2 Comitê de ética

Os procedimentos experimentais deste trabalho estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a licença de uso dos camundongos DBA/2 foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), registrada sob o protocolo nº 05/2017 (Anexo 2 e 2.1), e validada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP) (Anexo 3).

3.3 Avaliação das parasitemias e da curva de sobrevivência dos animais

Os camundongos foram infectados (Fig.10) com o parasita murino *P. berghei* ANKA, cuja infecção foi realizada via injeção intraperitoneal (IP), com 10^6 eritrócitos parasitados. O controle da parasitemia (porcentagem de eritrócitos infectados em relação ao total de eritrócitos) foi realizado por meio da análise de esfregaços

sanguíneos coletados da cauda de cada animal e corado com panótico rápido (NewProv), de acordo com as recomendações do fabricante. Os animais foram acompanhados diariamente e a parasitemia realizada a partir do 5º dia após a infecção. Após o óbito foi realizado a necropsia para identificação da causa da morte (SDRA ou HP) ou foram eutanasiados no 17º dia após a infecção, para evitar o sofrimento destes animais.

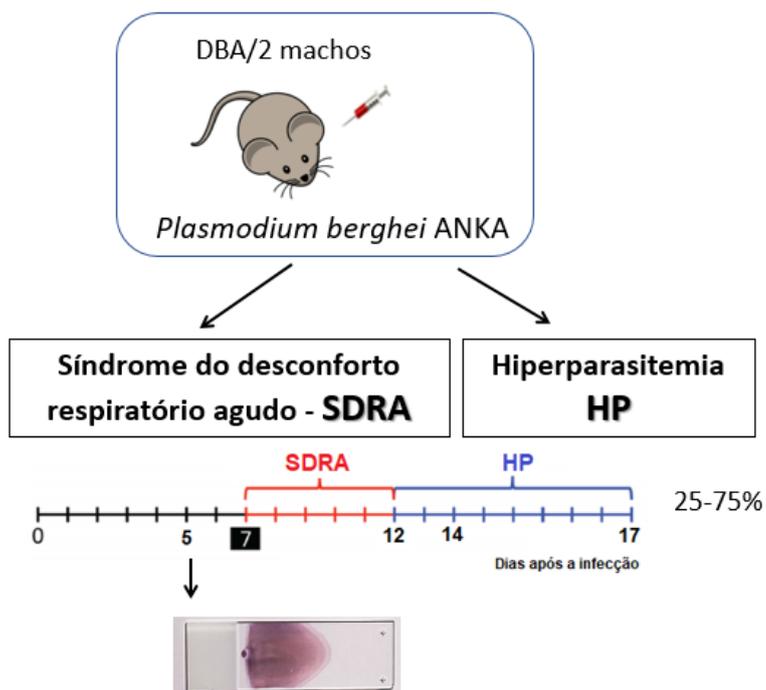


Figura 10 - Representação esquemática da malária experimental utilizada no estudo. Após a infecção dos camundongos da linhagem DBA/2 com eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA os animais foram acompanhados para identificação da causa de morte e, em média, 50% dos animais desenvolvem a síndrome do desconforto respiratório agudo. A avaliação da parasitemia a partir do 5º dia após a infecção.

3.4 Análise da função respiratória

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

3.5 Identificação da síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária em modelo murino pela técnica de diagnóstico por imagem - SPECT/CT

Camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, anestesiados (Cetamina 100 mg/Kg e Xilazina 10mg/Kg), foram colocados dentro do scanner do sistema Albira PET/SPECT/CT (Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, CT, USA) posicionados em prona. O equipamento dispõe de fonte de raios-x de 50Kv e detector planar baseado em CsI (TI) (iodeto de cério ativado por tálio), com área útil de 112 x112mm (Hamamatsu C7942). Foram adquiridos CT constituídos de 1000 projeções, com fonte de raios-x emitindo em 35KVp e 400 μ A. Albira foi previamente calibrado para unidades Hounsfield (HU). Os arquivos obtidos, em formato RAW, foram reconstruídos utilizando algoritmo “filtered back projection” (FBP) em software fornecido pelo fabricante (Albira Reconstructor 5.6), processo que resultou em arquivos em formato “analyze”, contendo imagens com voxel (pixel em 3 dimensões) isométrico de 0,125 mm (125 μ m).

3.5.1 Processamento e análise de imagens de CT

Inicialmente, foi selecionado como volume de interesse (VOI) todo toráx de cada animal. Foi aplicada máscara para todo volume de imagem que não estivesse no VOI fosse considerado transparente. Posteriormente, dentro do VOI, foi feita segmentação para seleção dos voxels com valores entre -1000 e +100 HU (RESKE et al., 2011). O arquivo binário obtido dessa segmentação foi utilizado para seleção de novo VOI no arquivo original, sendo esse considerado o volume total do pulmão. Na próxima etapa, os voxels selecionados, com valores de HU entre -1000 e +100, foram segmentados em 4 diferentes intervalos: 1) -1000 a -900 HU, classificado como tecido hiperaerado; 2) -900 a -500 HU, tecido normalmente aerado; 3) -500 a -100 HU, tecido pobremente aerado e; 4) -100 a +100 HU, tecido não aerado. Os volumes totais de cada tecido foram calculados a partir do número de voxels e comparado com volume total de pulmão. O processamento de todas as imagens foi realizado com software PMOD 3.2 (PMOD Technologies, Zurich, Suíça).

3.5.2 Experimento com SPECT/CT

A perfusão pulmonar foi avaliada por SPECT. Para esse objetivo,

camundongos DBA/2 controles ou infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foram anestesiados (Cetamina 100 mg/Kg e Xilazina 10mg/Kg) e receberam em média 1,0 mCi de ^{99m}Tc -MAA (Pul-Tec, IPEN, São Paulo, Brasil) por via retro-orbital e após 1 hora, tempo de distribuição do radiofármaco os camundongos foram colocados dentro do scanner do sistema Albira PET/SPECT/CT (Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, CT, USA) posicionados em decúbito ventral. Foram adquiridas 60 projeções de SPECT, com duração de 30 segundos cada uma, com janela de energia determinada entre 112 e 168 KeV. Foi utilizado campo de visão (FOV – “field of view”) de 80mm e colimadores de único orifício. Após essa aquisição, foi feito CT, nas mesmas condições descritas anteriormente. Dados de SPECT foram reconstruídos com algoritmo OSEM, com correção de decaimento e sem correção de atenuação. As imagens de CT e SPECT foram fusionadas (sobrepostas) e a mesma análise descrita anteriormente foi realizada em dados de CT. Posteriormente, VOI para cada intervalo de valores de HU foram obtidos e aplicados na imagem de SPECT, quando, finalmente, foi avaliada a atividade de Tc^{99m} em cada uma dessas regiões.

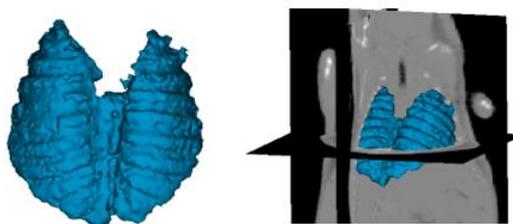


Figura 11 - Reconstrução pulmonar representativa da densitovolumetria pulmonar total pela tomografia computadorizada. Segmentação pulmonar utilizada no processamento dos dados das topografias com CT de referência.

Além disso, as imagens foram processadas valendo-se dos softwares 3D Slicer versão 4.9 (<http://www.slicer.org>) (FEDOROV et al., 2012) utilizando a ferramenta “segmentation” e “threshold” onde realizamos a segmentação da aeração pulmonar (Fig.12). Estes ensaios foram realizados com o equipamento multiusuário Fapesp (09/53800-9) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, instalado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Os experimentos foram realizados com o auxílio do responsável técnico Dr. Walter Miguel Turato.

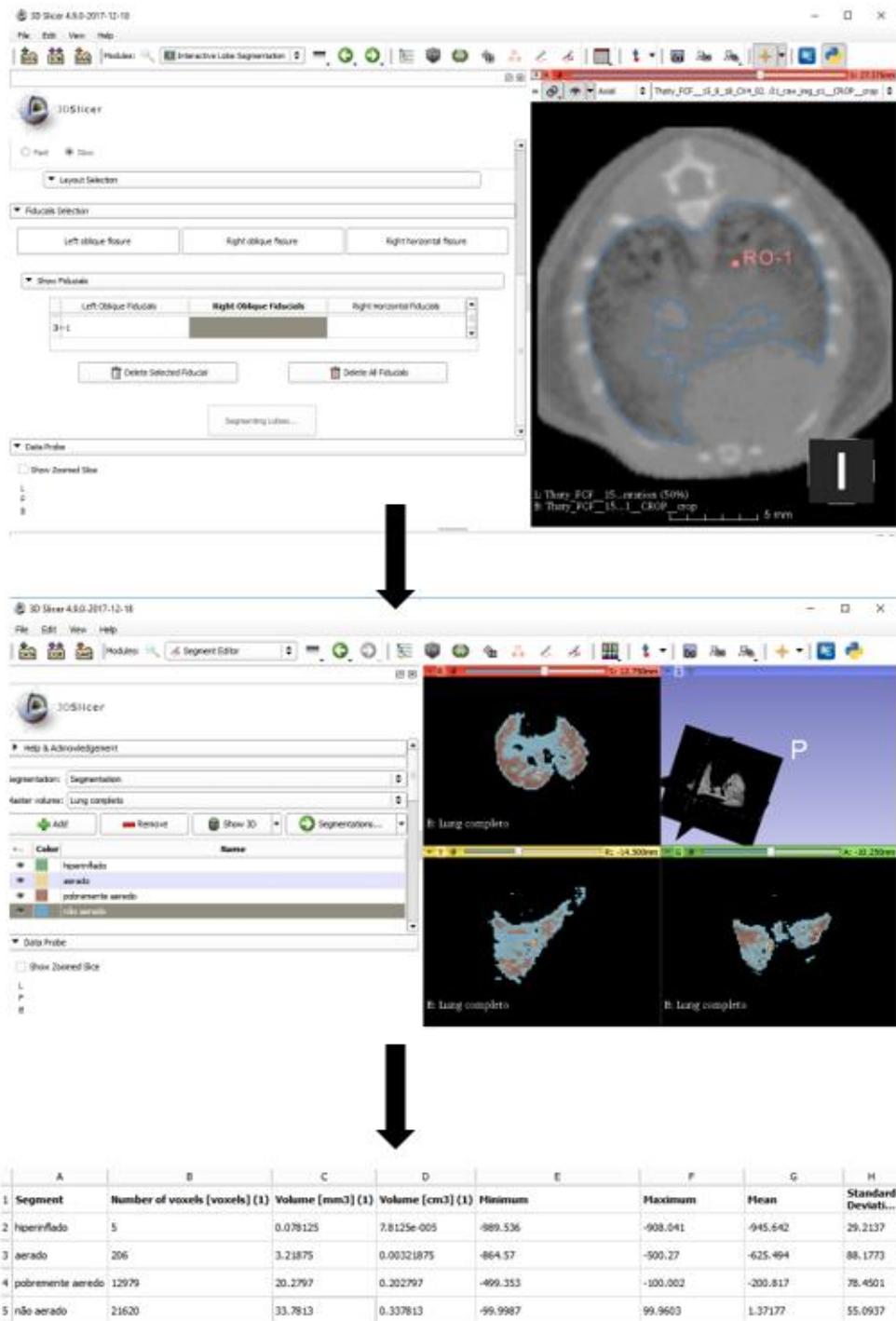


Figura 12 - Esquema representativo da quantificação da aeração pulmonar da tomografia computadorizada utilizando o software 3D slicer. As imagens tomográficas foram processadas utilizando o 3D slicer, para segmentar o pulmão do corpo do animal, após o procedimento foi determinado os pontos de corte utilizado no estudo através da ferramenta “segment editor” e “Threshold”. A quantificação foi realizada pela ferramenta “quantification” seguida de “Segmentation statistics”.

3.6 Isolamento das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos da linhagem DBA/2

As células endoteliais (Fig.13) dos pulmões foram obtidas a partir de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2), de acordo com o descrito em publicação prévia (CHEN; FEI; SHAO-HUALI, 1995; PEREIRA et al., 2016). Inicialmente foi realizado o isolamento das CEPP-DBA/2, em seguida a caracterização da pureza e ensaios experimentais.

Resumidamente, camundongos foram eutanasiados e todo o sangue foi retirado através da secção das artérias carótidas. O tecido pulmonar foi cortado em fragmentos de 1 mm² e adicionado a placas de 6 poços com meio DMEM suplementado com 0,1 mM de glicose, 100 U/mL de penicilina, 2 mM de glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina e 20% de soro fetal bovino. As placas são colocadas a 37°C com 5% de CO₂ durante setenta e duas horas, após as quais os tecidos foram removidos e o meio foi renovado. As células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2) foram mantidas com DMEM + 20% de soro fetal bovino durante quatro passagens (aproximadamente um mês), momento em que as células são utilizadas nos experimentos.

A imunofluorescência foi realizada nas culturas para a identificação da pureza da cultura das CEPP-DBA/2 então foram marcadas com os anticorpos primários vWF, eNOS, CD31, ACE, CD62-E e Ullex como descrito no anexo 4.

A viabilidade celular foi verificada com azul de tripan (1/100). Então, foram plaqueadas 8x10⁴ células para ensaios de imunofluorescência e com 1x10⁶ células para realização de Western Blot. As células então foram incubadas em estufa a 37°C, 5% CO₂, durante 12 horas para adesão, após este período, foram iniciados os ensaios experimentais.

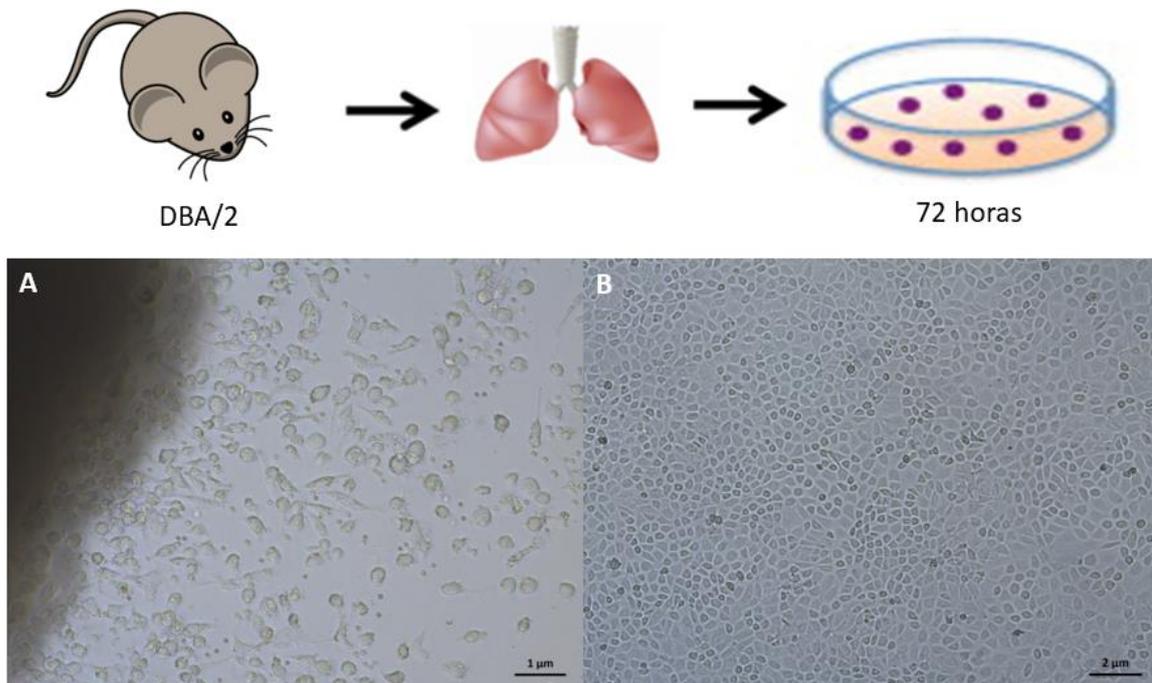


Figura 13 - Representação do protocolo de isolamento e preparo das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2). Os pulmões dos camundongos DBA/2 foram coletados para a realização da cultura primária, após 3 dias de cultivo (A) observamos que as células endoteliais se desprendem do tecido pulmonar (mancha escura no canto esquerdo) (aumento: 20x). Em (B) temos a fotomicrografia após 7 dias de cultivo das células endoteliais, onde podemos observar a morfologia e o aspecto de paralelepípedo (aumento: 10x). Fonte: Dra. Luana Ortolan (ORTOLAN, 2017).

3.7 Sincronização e isolamento de eritrócitos parasitados em esquizontes de *Plasmodium berghei* ANKA

Os eritrócitos parasitados (EP) foram obtidos através do sangue de camundongos infectados com o parasita *P. berghei* ANKA (EP-PbA) (entre 10% e 20%), por punção cardíaca e colocados em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB). Para obter formas maduras dos parasitas (trofozoítas e esquizontes), os EP-PbA foram sincronizados e purificados, de acordo como descrito (PEREIRA et al., 2016). Resumidamente, os parasitas foram mantidos *in vitro* a 37°C por 14h em atmosfera contendo 5% de CO₂, 85% de N₂ e 10% de O₂. Os eritrócitos foram, então, enriquecidos por separação em coluna magnética (MAC BEADS, Miltenyi Biotec, USA), resultando em populações celulares com cerca de 95% de EP-PbA (Fig.14). A coluna magnética utiliza as propriedades magnéticas da hemozoína para separar os eritrócitos parasitados, os quais ficam

aderidos na coluna, enquanto que os eritrócitos não parasitados não se aderem (MATA-CANTERO et al., 2014).

A fração de EP-PbA coletada pela coluna magnética foi lavada com meio de cultura DMEM (Gibco) e centrifugada à 1.000 rpm por 8 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e os EP-PbA foram ressuspensos em 3 mL de meio de cultura. Os eritrócitos não parasitados (ENP) foram obtidos do sangue de camundongos não infectados, também por punção cardíaca. Da mesma forma, o sangue coletado foi lavado com meio de cultura e centrifugado. Após descarte do sobrenadante, os ENP foram ressuspensos em 5 mL de meio de cultura. Para a realização dos ensaios experimentais, EP-PbA e ENP foram quantificados em câmara de Neubauer e adicionados as CEPP-DBA/2, na proporção de 25 EP-PbA ou ENP para cada célula endotelial por 1 hora de estímulo. Após o período foi realizado os ensaios experimentais.

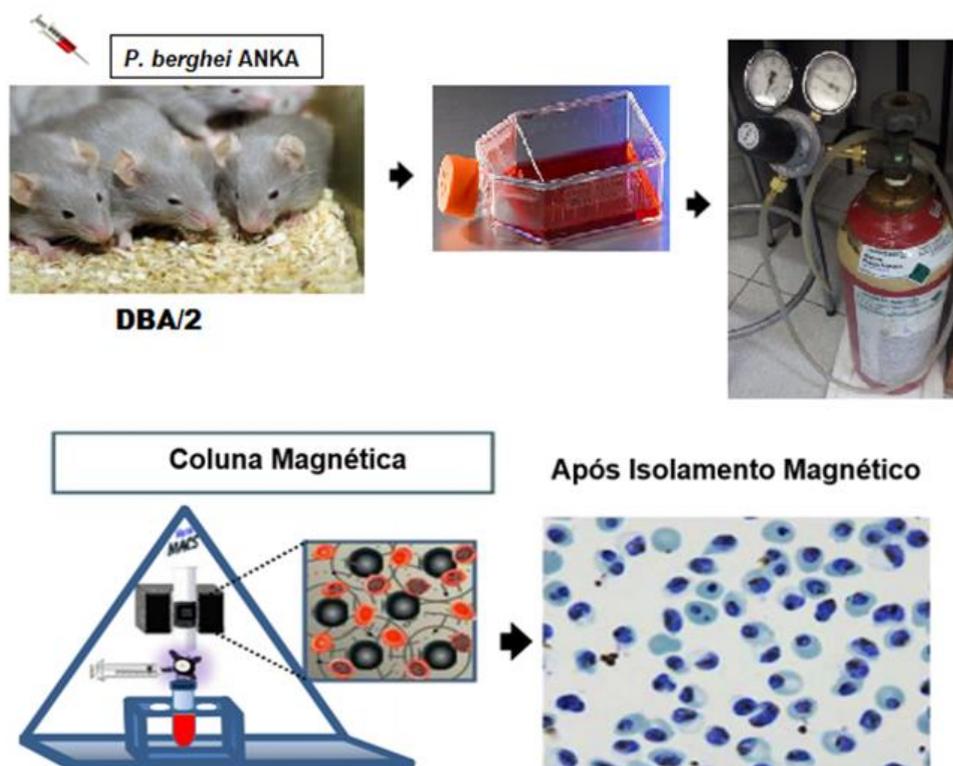


Figura 14 - Representação do protocolo de sincronização e isolamento de eritrócitos parasitados em esquizontes de *P. berghei* ANKA (EP-PbA). Os camundongos DBA/2 machos são inoculados com 10^6 eritrócitos parasitados, após 6 dias de infecção e ao sangue foi adicionado meio DMEM e soro fetal, mantidos em mistura gasosa de nitrogênio durante 14h à 37° graus para sincronização dos eritrócitos parasitados. Posteriormente, foi realizado o isolamento dos eritrócitos parasitados, por coluna magnética para obter 95% de pureza de EP-PbA. Adaptado de Mata-Cantero *et al.* Malaria Journal, 2014.

3.8 Identificação dos microfilamentos de actina por imunofluorescência

Para a avaliação dos microfilamentos de actina, as células foram incubadas em placas de poliestireno de 24 poços (8×10^4 células/poço), aderidas em gelatina, sobre lamínulas (Coverlips) e mantidas a 37°C e 5 % de CO_2 , por 72 horas, para formarem uma monocamada justaposta. Após o período para adesão e confluência total, as células foram lavadas com solução de PSB 1%, pré-aquecido, fixadas com formaldeído 3,7 %, permeabilizadas com Acetona (-20°C) e bloqueadas com albumina sérica bovina (BSA) 1%. Para verificar o rearranjo dos microfilamentos de actina, as CEPP-DBA/2 foram incubadas por 1 hora com 25 células de ENP (Eritrócito não parasitado), iEP-PbA (Estímulo indireto com eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA), EP-PbA (Contato direto com eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA) para cada célula endotelial. Controles negativos foram realizados com as células não estimuladas (NE). Assim, após incubação com Texas Red Phalloidina alexa flúor™ 546 (A22283, Life Technologies), por 20 minutos na diluição 1:200. Os núcleos celulares foram marcados, com Hoechst (H-33342, Life Technologies), na diluição 1:1000 por 5 minutos. 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). As imagens foram capturadas pelo microscópio de fluorescência AXIO Imager M2 (Zeiss) e com a câmera AxioCam HRc.

3.9 Avaliação da abertura das junções interendoteliais

A área dos espaços intercelulares foi quantificada para verificar possíveis diferenças entre os tipos de estímulo. Para isso, foi utilizada a ferramenta Count/Size do Software ImageJ (versão 4.5.0.29). Cada imagem foi analisada individualmente e as aberturas das junções interendoteliais (“J-int”) foram circuladas manualmente, onde a área de cada “J-int” foi calculada. Assim, a soma da área resultou na porcentagem total de aberturas das junções interendoteliais formadas, para cada imagem. Em seguida, foi calculada a média de área total de todas as imagens analisadas, de cada tipo de estímulo. Além disso, foi calculada a densidade média (grau de escurecimento) de cada área circulada. Esta medida, que vai do nível 0 (preto) a 255 (branco), foi utilizada apenas como garantia de que não foram escolhidas nenhuma região

marcada com Texas Red Phalloidina. Todas as imagens apresentavam a área total de 37.552.549 μm^2 e foram obtidas nas mesmas condições, com lente objetiva de 40x.

3.10 Ensaio da integridade da barreira endotelial

As células endoteliais foram plaqueadas 4×10^4 cel/poço, em placa de 24 poços (poliéster; 6,5mm diâmetro) contendo membrana permeável (*Transwell*), e cultivadas em meio DMEM, por 36h (Fig.15). Assim, estas células foram expostas ao EP-PbA, iEP-PbA ou ENP, na proporção de 25:1, por 1h. Os iEP-PbA são EP-PbA adicionados no compartimento inferior da *transwell*, ou seja, com contato indireto nas células endoteliais, uma vez que as CEPP-DBA/2 foram plaqueadas no compartimento superior da membrana. Após o tempo de exposição ao estímulos com e sem eritrócito parasitado foi aplicado 0,5mg/mL de Azul de Evans e realizada a incubação de 45 min a 37°C, em 5% de CO₂, após a incubação o material na região inferior do transwell foi coletado para a quantificação do azul de Evans e analisado em espectrofotômetro (650nm).

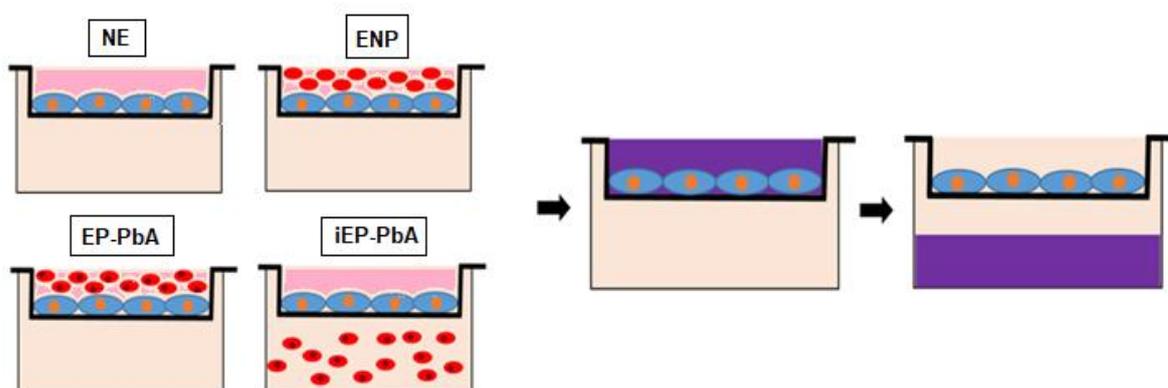


Figura 15 - Esquema dos ensaios experimentais com sistema de Transwell®. As células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 foram cultivadas sobre a membrana permeável do inserto (Transwell®) e estimuladas de forma indireta com iEP-PbA, EP-PbA, ENP ou não estimuladas como controle negativo. Após o período do ensaio os estímulos foram removidos e adicionamos o corante azul de Evans no compartimento superior. Em seguida foi realizado a quantificação da concentração de Azul de Evans do compartimento inferior, que atravessou a monocamada de células e os poros da membrana (iEP-PbA: estímulo indireto com eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; ENP: eritrócitos não parasitados).

3.11 Ensaios de imunofluorescência para identificação das junções interendoteliais

Para os ensaios experimentais a CEPP-DBA/2 foram plaqueadas com 8×10^4 células/poço, sob uma lamínula de vidro 12 x 0,11mm (Coverlips - Uniscience), e após período de 24h foram estimuladas por 1h com 25 EP-PbA/célula ou com 25 eritrócitos não parasitados (ENP)/célula ou as células não foram estimuladas (NE). As CEPP-DBA/2, após o período dos estímulos, foram lavadas com PBS e foi realizado o ensaio de imunofluorescência para identificação da Cx43, OCL, JAM-B, CLDN5, ZO-1 e VE-Caderina. Os detalhes de cada imunofluorescência encontram-se no anexo 5. Todas as soluções e anticorpos foram diluídos em PBS 1x. As lamínulas foram colocadas sobre lâminas de microscopia de vidro, contendo o meio de montagem Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma). As lâminas foram analisadas pelo microscópio de fluorescência Zeiss (Axio imager M2) com a câmera AxioCam HRc com lente objetiva de 40X.

3.12 Análise morfométrica das junções interendoteliais

A análise morfométrica foi realizada pelo Software ImageJ (ImageJ/Fiji version 1.51g) sendo realizadas cinco fotos por lâmina em campos distintos. As alterações nas junções interendoteliais de CEPP-DBA/2 foram avaliadas com a ferramenta "Threshold". A partir das imagens originais, foram geradas imagens binárias que representam a região marcada pelas proteínas de interesse (Fig.16). Assim, para cada imagem, a fluorescência celular total corrigida (FCTC) = densidade integrada da proteína [DI] – (área total [AT] X média de níveis de cinza do background [MCB]), como descrito na literatura (MCCLOY et al., 2014) e demonstrado a partir da seguinte fórmula:

$$FCTC = DI - (AT \times MCB)$$

Para adicionar a barra de escala foi utilizada a ferramenta "Scale bar", para separar os canais de fluorescência "Split channels" e para unir os canais e confeccionar as figuras do presente estudo o recurso "Merge channels".

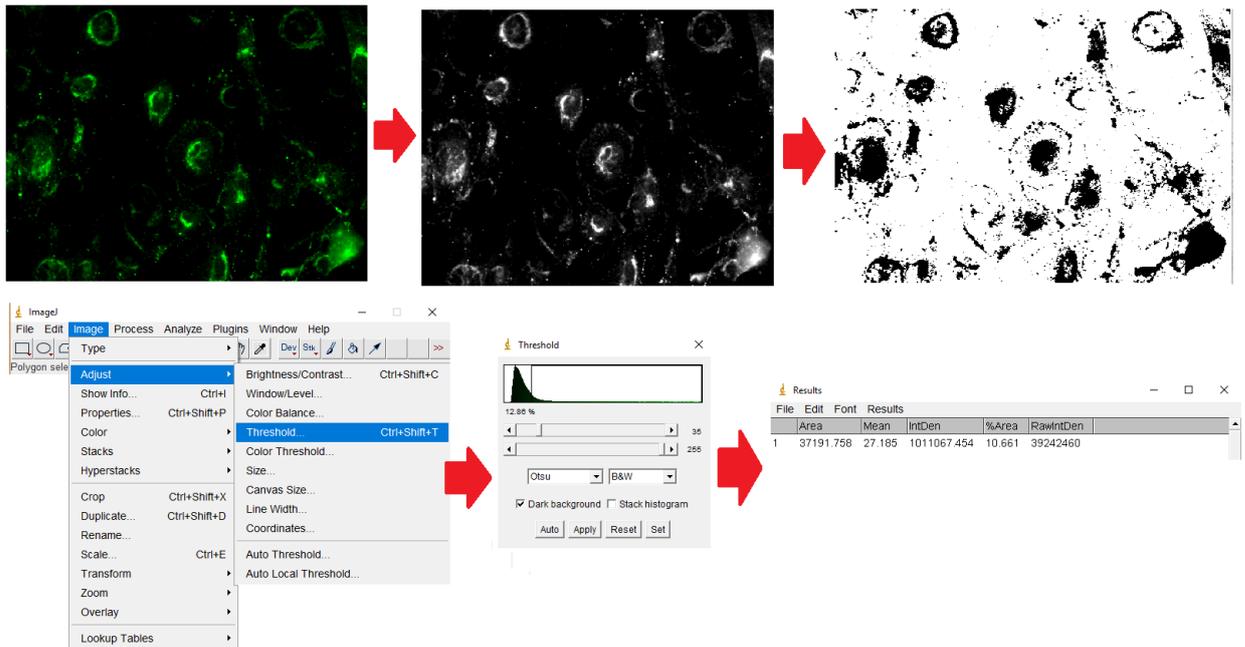


Figura 16 - Exemplo da quantificação das alterações das junções interendoteliais. A partir de imagens originais são produzidas imagens binárias, que representam a região marcada pelas proteínas de interesse. Foram determinadas as áreas totais ocupadas pelas marcações dos anticorpos para as junções interendoteliais, a fração da área ocupada, a média de níveis de cinza e a densidade integrada. Imagem referente ao grupo NE, reproduzida com lente objetiva de 40X. NE: não estimuladas.

3.13 Extração de proteínas das amostras para Western blot

A extração de proteínas das amostras de CEPP-DBA/2 foi realizada com solução de RIPA, utilizando os inibidores de protease e fosfatos: pirofosfato de sódio e ortovanadato de sódio (sigmafest inibidor) por 30 min a 4º graus sob agitação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas à 16.000g por 20 min e o sobrenadante foi coletado, as proteínas solúveis foram armazenadas em freezer -80 até o momento dos ensaios.

3.14 Determinação de proteína total nas amostras celulares

Para a quantificação de proteína total das amostras de cultura de CEPP-DBA/2 foi utilizado o kit BCA (bicinchoninic acid, Pierce, Rockford, IL, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada a 562 nm, comparando-se com curva-padrão de albumina.

3.15 Expressão de proteínas pela técnica de Western Blot

A quantificação total das proteínas da junção interendoteliais foi realizada pela técnica de Western blot. Os ensaios foram realizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1%, conforme orientação do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os géis de corrida e de empilhamento foram a 12,5% e 4,5% de poliacrilamida, respectivamente. As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 62,5 M, contendo 10% de glicerol, 2% de SDS, 5% de β -mercaptoetanol e 0,001% de azul de bromofenol. As amostras foram incubadas em banho seco por 5 min à 99°C e, 30 μ g de proteínas foram adicionadas ao gel de poliacrilamida-SDS. A separação das proteínas ocorreu em cuba de eletroforese (tampão de corrida: Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,5%) a 100v, por aproximadamente 130 minutos. Cinco μ l do padrão de peso molecular de proteínas (Thermo Scientific PageRuler Plus) foi usada. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de Polyvinylidene difluoride (PVDF) poro: 0,45 μ m, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; metanol 20%), a 400 mA durante 90 minutos. Para minimizar as ligações inespecíficas, após a transferência a membrana de PVDF, foi deslocada para uma solução de leite desnatado (5%) em tampão Tris-salina (TBS) durante 1 hora. Posteriormente, essa membrana foi incubada, sob agitação e à 4° graus, com anticorpos primário e secundário durante 15-18 horas e 1 horas, respectivamente. A cada etapa de incubação a membrana foi lavada com TBS-T durante 5 minutos por 3 vezes consecutivas. A revelação foi realizada utilizando ECL (enhanced chemiluminescence – ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). As densidades relativas das bandas foram determinadas por meio de análise densitométrica utilizando o software Image Lab™ versão 6.0 (Bio-Rad).

3.16 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média. Todos os dados foram analisados pelo teste de normalidade D'Agostino-Pearson, que indicou que os dados eram não paramétricos. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis (seguido do pós-teste de Dunn's), dependendo do número de grupos analisados em cada experimento. Foi realizado o teste de Spearman ou Pearson (r) na análise de

correlação e regressão linear dos dados. As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 5®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária em modelo murino.

Os camundongos DBA/2 após infecção com *Plasmodium berghei* ANKA foram observados até o 17ºdpi (dia após a infecção) para avaliação do desenvolvimento da SDRA ou HP. A infecção promove o desenvolvimento da SDRA e os camundongos vão ao óbito entre o 7º e 12º dia após a infecção, onde apresentam alterações dos parâmetros respiratórios, com a diminuição da frequência respiratória (bpm) e aumento da pausa respiratória (Penh). Além disso, foi identificado a presença de edema e hidrotórax (em 100 % dos casos), hemorragia pulmonar, conforme publicado anteriormente pelo nosso grupo (EPIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014).

Para a caracterização do modelo experimental é necessário a mensuração da sobrevivência, parasitemia e parâmetros respiratórios com o objetivo de identificar os animais que desenvolvem SDRA ou HP.

Os camundongos que desenvolvem a SDRA foram ao óbito (Fig.17A) entre o 7 e 12º dpi (faixa amarela), com edema pulmonar e hemorragia, enquanto os camundongos com HP morreram após o 13ºdpi com o pulmão acinzentado devido ao acúmulo de pigmento malárico. Foram realizadas as parasitemias dos animais durante todo o experimento a partir do 5º dia após infecção (Fig. 17B) e observamos que os camundongos com SDRA apresentam maiores concentrações de eritrócito parasitado que os animais que desenvolveram hiperparasitemia. Os camundongos no 5ºdpi não apresentam diferenças significativas na mensuração dos parâmetros respiratórios (Fig. 17C-H). Entretanto, os camundongos no 7ºdpi que desenvolvem SDRA apresentaram diminuição da frequência respiratória (Fig.17C), aumento da pausa respiratória (Fig.17D), diminuição do volume tidal (Fig. 17E), diminuição do volume de ventilação (Fig. 17F), prolongamento do tempo de expiração (Fig. 17G) e não apresentaram diferenças significativas no tempo de inspiração (Fig. 17H) quando

comparados aos animais não infectados ou que desenvolveram hiperparasitemia devido a insuficiência respiratória causada pela efusão pleural.

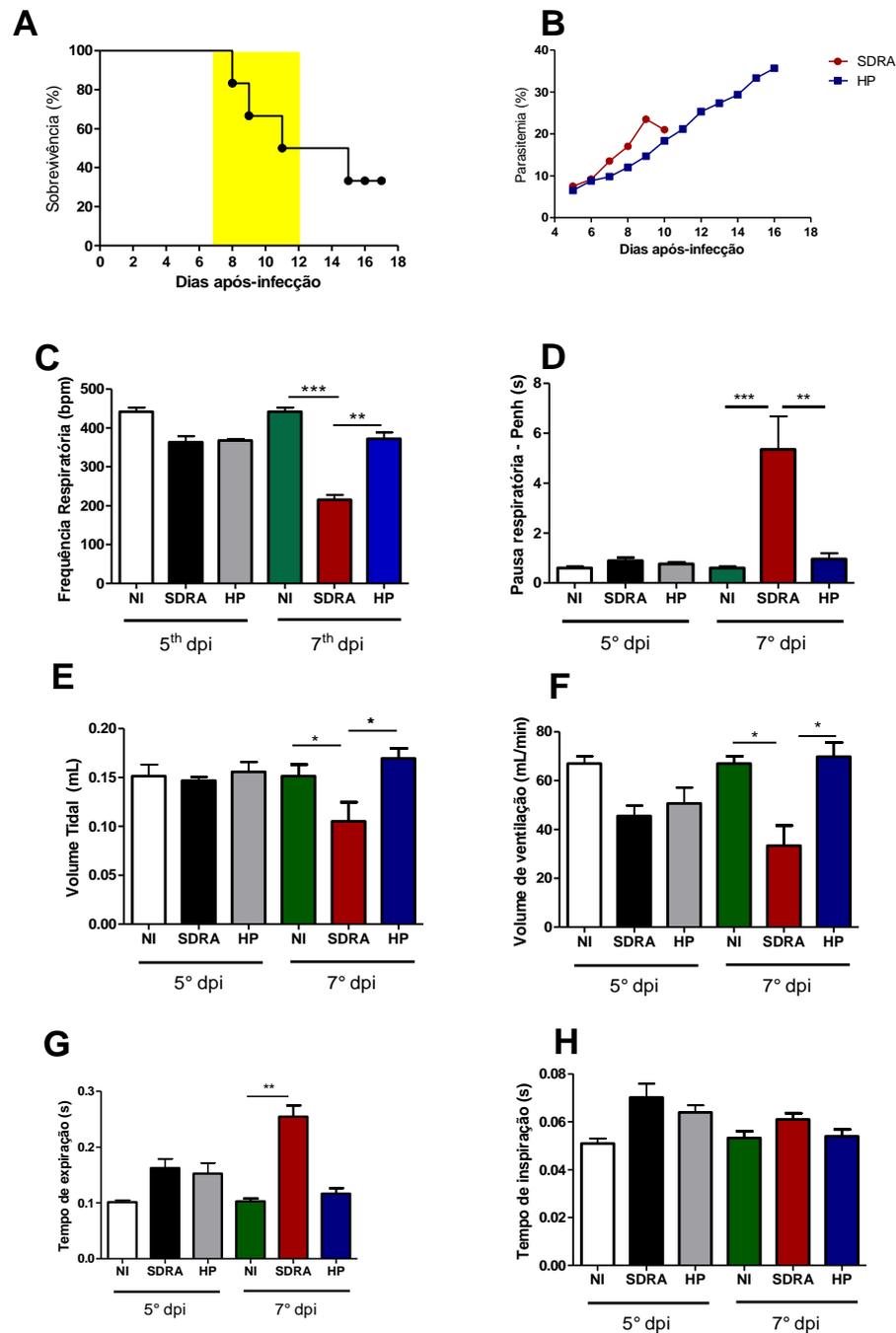


Figura 17. Avaliação da sobrevivência, parasitemia e parâmetros respiratórios durante o modelo experimental de SDRA associada a malária. (A) Curva de sobrevivência, (B) Parasitemia, (C) Frequência respiratória- batimentos por minuto, e (D) Pausa respiratória- segundos (Penh) (E) Volume corrente – ml, (F) Volume de ventilação – ml/minuto, (G) Tempo de expiração - segundos e (H) Tempo de inspiração - segundos no modelo experimental de SDRA associado a malária após o 5^o e 7^odpi.

Dados apresentados como média e erro padrão. Kruskal-Wallis. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. Figuras representativas de 2-3 experimentos independentes. n =10-14 por experimento. NI= Não Infectado, SDRA= Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, HP = Hiperparasitemia, dpi= dias pós a infecção.

Alterações nos parâmetros respiratórios são cruciais na identificação de lesão pulmonar. Em pacientes com SDRA ocorre a diminuição da frequência respiratória e aumento da resistência pulmonar devido a deficiência na oxigenação pulmonar e o acompanhamento do estado ventilatório, que é fundamental para evitar a morte do paciente (CHEN et al., 2016).

Ortolan e colaboradores em seu estudo sobre os critérios preditivos para o desenvolvimento da SDRA associado a malária, utilizava a curva ROC para parasitemia, frequência e aumento da pausa respiratória (Pehn), mensurados no 7ºdpi, que identifica o desenvolvimento ou não da SDRA. Neste modelo preditivo, não é possível identificar o desenvolvimento da SDRA ou não mais precocemente, pois no 5ºdpi não houve diferenças significativas nos parâmetros respiratórios. Os resultados no presente estudo foram semelhantes aos demonstrados por Ortolan e colaboradores, pois além dos animais no 7ºdpi apresentaram alta parasitemia em comparação com o HP e irem ao óbito entre os dias 7 e 12º dpi apresentando hemorragias, edema pulmonar e hidrotórax, os parâmetros respiratórios (7ºdpi) indicaram diminuição da frequência respiratória e aumento da pausa respiratória devido ao desenvolvimento da SDRA (ORTOLAN et al., 2014).

A mensuração da diminuição do volume tidal durante o desenvolvimento da SDRA é fundamental para o acompanhamento de pacientes durante a ventilação mecânica e demonstra a insuficiência da ventilação pulmonar sendo necessário ajustes do PEEP para reduzir o risco de morte do paciente em 22% em unidades de terapia intensiva (PATRONITI; PESENTI, 2003; CHEN et al., 2016) O Volume tidal possui correlação com a complacência pulmonar durante a SDRA ocorre a diminuição do volume tidal devido a acidose respiratória (GUERRERO et al., 2007).

Em humanos que desenvolveram SDRA ocorre o aumento da pausa inspiratória (AGUIRRE-BERMEIO et al., 2016) e tempo de inspiração (MERCAT et al., 2001) devido a deficiência nas trocas gasosas pulmonares induzindo o barotrauma nos pacientes. O prolongamento do tempo de expiração é observado em pacientes

durante a SDRA demonstrando a diminuição da ventilação e promovendo o colapso pulmonar (SAHETYA; GOLIGHER; BROWER, 2017). Durante a SDRA em modelo murino a mensuração do aumento do Penh e volume de ventilação demonstram a dificuldade nas trocas gasosas e falha na função pulmonar (BATES et al., 2002; AEFNER; BOLON; DAVIS, 2015), o Penh é um parâmetro muito utilizado pois é possível avaliar de maneira não invasiva a função pulmonar (EIPHANIO et al., 2010; VERHEIJDEN et al., 2014). Entretanto, estas medidas não podem ser correlacionado com a resistência pulmonar, sendo necessário estudos de mecanismo de ventilação (LUNDBLAD et al., 2007).

4.2 Caracterização e diagnóstico por imagem da síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária experimental por tomografia computadorizada

Como já dito e demonstrado anteriormente, os camundongos da linhagem DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA apresentam dois fenótipos distintos, onde cerca de 50% morrem entre o 7° e 12° dia com sinais de SDRA e os outros animais morrem após o 13° dia com anemia grave e hiperparasitemia (HP). Valendo-se deste modelo, utilizamos o método de tomografia computadorizada para avaliar precocemente as lesões pulmonares. A avaliação pulmonar é baseada na unidades de Hounsfield onde, quanto mais escuro (preto) o tecido, maiores os níveis de aeração (HOUNSFIELD G.N, 1973). A análise qualitativa da aeração pulmonar durante a SDRA experimental demonstrou que os camundongos no 7°dpi que desenvolveram SDRA apresentam diminuição acentuada de aeração (Fig. 18), intensas áreas semelhantes a atenuação de consolidação, juntamente com a opacificação bilateral difusa em todos os cortes topográficos, quando comparado aos animais não infectados, que possuem o pulmão com aspecto saudável e intensa aeração ou camundongos no 5°dpi que desenvolveram SDRA. Os camundongos que desenvolveram hiperparasitemia no 7°dpi, apresentam diminuição de tecidos aerados e opacificação acentuada quando comparados aos animais no 5°dpi com HP ou camundongos não infectados. Os animais com hiperparasitemia no 14°dpi apresentam aumento do tecido pulmonar aerado com aspecto sugestivo a atenuação de reticulação quando comparado aos camundongos que desenvolveram HP no 7°dpi. Observamos a predominância de lesões pulmonares com aspecto de atenuação de

vidro fosco nos camundongos com SDRA no 7ºdpi, demonstrando a diminuição da capacidade respiratória e colapso alveolar.

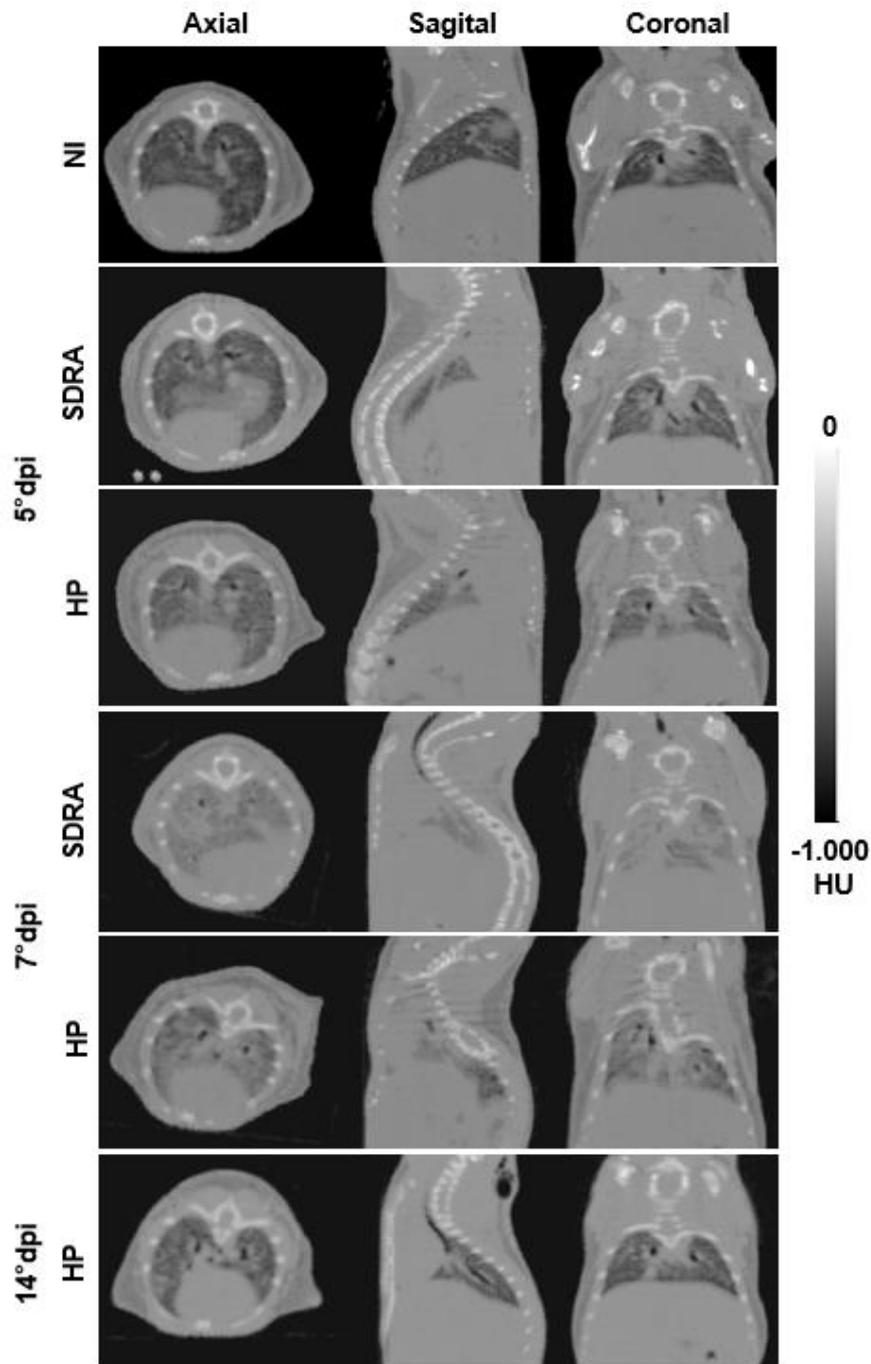


Figura 18 – Avaliação morfológica durante o desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo associada a malária experimental pela tomografia computadorizada. Imagens topográficas representativas de camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA. Escala de cinzas pelas Unidades de Hounsfield 0 HU (Densidade da água) à -1.000 HU (Densidade do ar). De 2 a 4 experimentos independentes, onde n = 7-14/experimento. NI= Não infectado, SDRA= Síndrome do desconforto respiratório agudo, HP= Hiperparasitemia, dpi= dias pós a infecção.

A radiografia de tórax e a tomografia computadorizada são utilizadas no diagnóstico de SDRA associada a malária possibilitando a identificação da opacificação bilateral difusa “pulmão branco” e lesões pulmonares em humanos (SALERI et al., 2006; ELZEIN et al., 2017), entretanto, em modelo murino observamos a predominância da opacificação difusa no lobo esquerdo (ORTOLAN et al., 2014) e em regiões não dependentes (ápice ou base pulmonar) (MA et al., 2016).

A análise morfológica dos tecidos pulmonares é essencial para a realização do diagnóstico durante a SDRA. Entretanto, é necessário a conferência de dois radiologistas experientes para confirmação das lesões, o que torna as análises quantitativas fundamentais para otimizar o tempo de processamento e promover maior acurácia diagnóstica (SUN; ZHANG; DUAN, 2006; VERGANI et al., 2017). As principais lesões identificadas durante a SDRA são intensas áreas de atenuação de vidro fosco que demonstram a baixa aeração e atenuação de consolidação na fase aguda que demonstra a efusão pleural e inflamação pulmonar (PESENTI et al., 2001; CHIUMELLO et al., 2013; MA et al., 2016; SIMON et al., 2016). Ainda é possível observar a atenuação de reticulação na fase tardia demonstrando o espessamento dos septos interlobulares, devido ao acúmulo de células inflamatórias e fibrose (MARKSTALLER et al., 2001; DE MATOS; BARBAS, 2011; ZOMPATORI; CICCARESE; FASANO, 2014).

A avaliação morfológica durante a SDRA é amplamente utilizada para detecção da efusão pleural (PESENTI et al., 2016). A opacificação difusa na região basal e dependente e distúrbio no parênquima pulmonar pelo acúmulo de tecido não aerado em estágios precoces também podem ser observados em pacientes com SDRA, evidenciando o edema (DE MATOS; BARBAS, 2011; VERGANI et al., 2017; FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018).

A diminuição da aeração pulmonar (>40%) e aumento da permeabilidade vascular estão relacionados a diminuição da complacência, devido a deficiência nas propriedades elásticas do pulmão durante a SDRA (ROUBY et al., 2003; HOCHHEGGER et al., 2010). Tal achado é compatível com nossos resultados, pois os animais com SDRA apresentaram edema pulmonar, além de hidrotórax, onde os camundongos podem apresentar até 1ml de líquido na cavidade torácica, o que dificultaria a complacência. Após 14º dias de infecção observamos uma melhora na aeração pulmonar em relação ao 7º dia após a infecção, assim como a capacidade

respiratória dos animais com HP apresentaram melhora, evidenciado pelo retorno aos níveis basais da frequência respiratória e Penh, semelhante aos animais não infectados, no 21º após a infecção (ORTOLAN et al., 2014).

A tomografia computadorizada de tórax apresenta alta sensibilidade na identificação das lesões pulmonares durante a SDRA, sendo que 85% dos pacientes apresentaram lesões bilaterais e no segmento anterior do pulmão esquerdo, sendo que apenas 5% dos pacientes com SDRA não apresentaram estas características, o que demonstra a alta sensibilidade da técnica quando comparada com a radiografia de tórax (NEGRIN et al., 2017).

Diferentes equipamentos de CT podem ser utilizados, porém a limitação na resolução das imagens de CT prejudica a acurácia do diagnóstico precoce da SDRA (CEREDA et al., 2017). O CT multislice que possui 64 detectores permitindo projeções entre 40-70 μm e o μCT que permite imagens com resoluções inferiores a 10 μm , enquanto, que a CT convencional permite a aquisição das projeções em mm (FRED, 2004; IONESCU et al., 2011), o que dificulta a avaliação das lesões pulmonares durante a SDRA em equipamentos convencionais (SIMON, 2005).

4.2.1 Avaliação da aeração pulmonar durante a síndrome do desconforto respiratório agudo associada a malária experimental

As análises detalhadas da aeração pulmonar consistiu em quatro *ranges* diferentes, de acordo com protocolo proposto (GATTINONI et al., 2001; RESKE et al., 2011; WOLF et al., 2015; PESENTI et al., 2016), onde os resultados foram segregados em -1.000 até -900 (hiperinflado), -900 até -500 (normalmente aerado), -500 a -100 (pobrememente aerado) e 0 até +100 (não aerado). Estes intervalos são justificados por determinar características pulmonares e diferentes intensidades de ar no interior dos pulmões.

A quantificação da aeração pulmonar (Fig.19) demonstrou que, após a infecção com o *Plasmodium berghei* ANKA, os camundongos em todos os dias analisados tiveram uma redução acentuada nos tecidos hiperinflados (Fig. 19A) quando comparado ao camundongo não infectado, entretanto, os camundongos que desenvolveram SDRA n 5º e 7º dpi apresentaram diferença significativa quando comparado ao controle não infectado ($p < 0,05$), não houve diferença significativa entre

os tecidos hiperinflados dos camundongos que desenvolveram SDRA ou HP no 5ºdpi ou 7ºdpi ($p>0,05$).

Camundongos não infectados apresentaram maiores valores de tecido normalmente aerado (Fig. 19B) quando comparados aos camundongos infectados. Entretanto, os camundongos com SDRA no 5º e 7ºdpi, apresentaram os menores valores de aeração, demonstrando o comprometimento pulmonar (NI vs SDRA no 5ºdpi $p<0,001$, NI vs SDRA no 7ºdpi $p<0,001$). Não foram observadas diferenças significativas entre a aeração pulmonar entre os camundongos com SDRA ou HP no 5ºdpi ou 7ºdpi ($p>0,05$), porém os camundongos com SDRA demonstraram diminuição de tecidos aerados (hiperinflados e normalmente aerados) entre o 5ºdpi quando comparado ao 7ºdpi ($p<0,01$), sugerindo que a avaliação longitudinal permite a identificação dos animais que desenvolvem SDRA mais precocemente, visto que o perfil de aeração dos camundongos que desenvolvem HP não altera no 5ºdpi quando comparado ao 7ºdpi ($p>0,05$).

Os tecidos pobremente aerado nos camundongos com SDRA apresentaram diminuição significativa quando comparados aos camundongos HP (Fig. 19C) (SDRA vs HP 5ºdpi $p>0,01$, SDRA vs HP 7ºdpi $p>0,001$). Além disso, observamos maiores áreas de tecidos pobremente aerados nos camundongos que desenvolveram a SDRA no 5ºdpi quando comparada ao 7ºdpi (SDRA 5ºdpi vs SDRA 7ºdpi $p>0,01$). Os camundongos HP no 14ºdpi apresentam o aumento dos tecidos pobremente aerados quando comparado aos animais no 7ºdpi (HP 7ºdpi vs HP 14ºdpi $p>0,01$).

Também foi observado que houve aumento de tecidos não aerados (Fig. 19D) nos camundongos com SDRA (5º e 7ºdpi) quando comparados aos controles não infectados (NI vs SDRA 5ºdpi $p<0,05$ e NI vs SDRA 7ºdpi $p<0,01$). Ainda, os camundongos que desenvolvem SDRA no 5ºdpi e 7ºdpi apresentam maiores áreas de tecido não aerado quando comparados aos camundongos HP (SDRA vs HP $p>0,05$) e, finalmente, os camundongos que desenvolveram HP no 14ºdpi demonstraram uma redução dos tecidos não aerados quando relacionados aos animais HP no 7ºdpi (HP 14ºdpi vs HP 7ºdpi $p>0,05$). Os camundongos no 7ºdpi apresentaram aproximadamente 80% do tecido pulmonar não aerado com valores superiores a 4 vezes aos encontrados no controle não infectado, demonstrando o acúmulo de líquido (edema) e o aumento da permeabilidade vascular pulmonar. Após o 5ºdpi durante a SDRA os animais apresentaram 2 vezes mais tecidos não aerados

quando comparados aos controles, permitindo identificar precocemente a colabamento pulmonar.

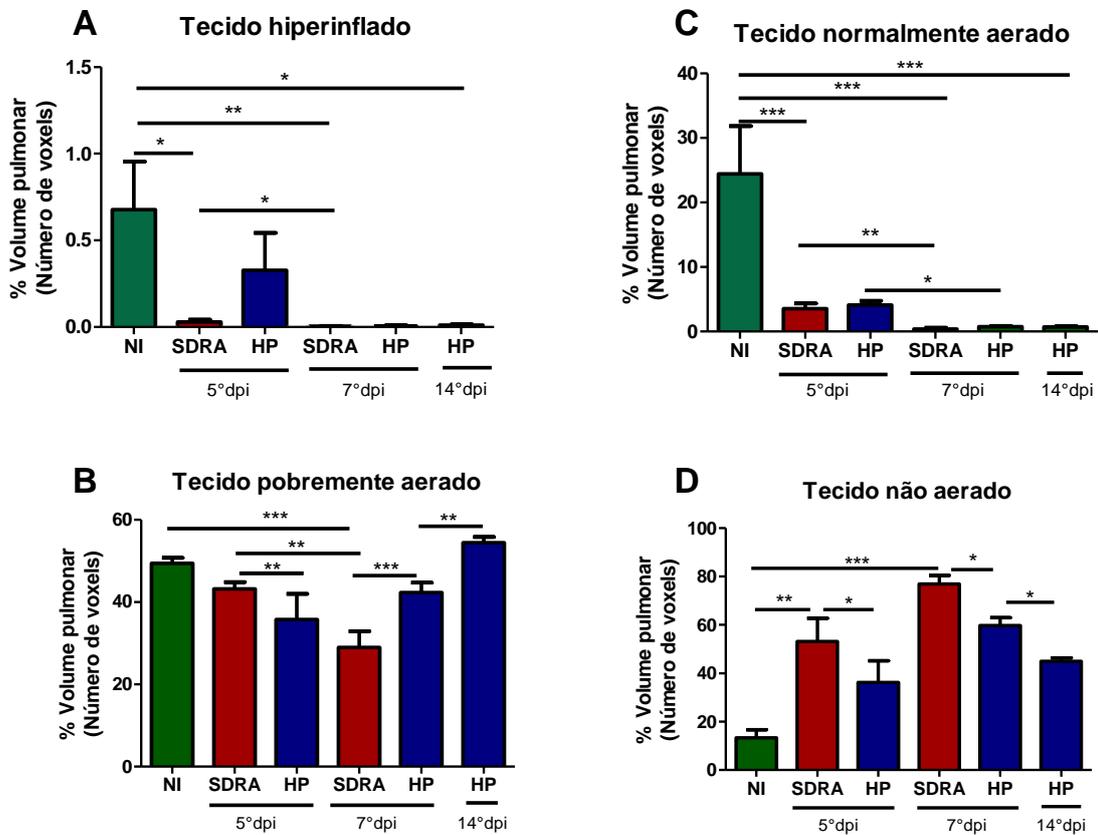


Figura 19 – Diminuição da aeração pulmonar na malária experimental. Quantificação da aeração pulmonar pela tomografia computadorizada em camundongos DBA/2 após 5°, 7° e 14° dias de infecção com *Plasmodium berghei* ANKA. (A) A infecção com o *Plasmodium berghei* ANKA promove a redução dos tecidos hiperinflados quando comparado aos animais não infectados, (B) tecidos normalmente aerados reduziram durante a malária experimental, (C) tecidos pobremente aerados diminuíram nos camundongos que desenvolveram SDRA, (D) tecidos não aerados estão elevados em camundongos com SDRA. Imagens representativas de 2-4 experimentos independentes, onde n = 7-14/experimento. Kruskal-Wallis. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. NI= Não infectado, SDRA= Síndrome do desconforto respiratório agudo, HP= Hiperparasitemia, dpi= dias pós- infecção.

A quantificação pela segmentação da aeração pulmonar durante a SDRA tanto em modelo animal quanto em humanos demonstra ser um ferramenta eficiente no diagnóstico pois facilita a interpretação dos dados (KARMRODT et al., 2006; KLAPSING et al., 2017). Recentemente, em humanos foi descrito que durante a SDRA ocorre a diminuição dos tecidos hiperinflados e normalmente aerados, redução dos tecidos pobremente aerados e aumento dos tecidos não aerados com valores

superiores a 2 vezes, quando comparados aos pacientes controles, demonstrando a presença do colapso alveolar e as falhas na função respiratória, resultado semelhante ao encontrado no estudo (KARMRODT et al., 2006).

O aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar associado a diminuição do surfactante e inflamação pulmonar promove a indução da atelectasia (ROUBY et al., 2003). A redução da aeração pulmonar geral é observada durante a SDRA demonstrando o colapso pulmonar, decorrente do edema (ATUL MALHOTRA, 2007; RESKE et al., 2011).

O aumento dos tecidos não aerados é um marco na avaliação da aeração pulmonar durante a SDRA (ROUBY et al., 2003), pois os valores podem ultrapassar à 50 vezes aos encontrados nos controles (voluntários), sendo uma ferramenta importante na identificação das lesões pulmonares. Além disso, ocorre a diminuição dos tecidos hiperinflados e normalmente aerados com predominância no lado direito (PUYBASSET et al., 2000; MARKSTALLER et al., 2001). Apesar de no presente estudo encontramos diminuídos os tecidos hiperinflados e normalmente aerados, não foram observadas diferenças na aeração entre os lóbulos direito e esquerdo. Portanto, a análise da aeração pulmonar durante a SDRA permite a identificação das falhas na oxigenação pulmonar precoce, que pode evitar a alta mortalidade dos pacientes em unidade de terapia intensiva (DAKIN et al., 2012).

Nas reconstruções 3D da aeração pulmonar do presente estudo podemos observar nas topografias em coronais pequenas áreas de tecido hiperinflado nos animais não infectados e, após a infecção, ocorreu a diminuição tanto nos animais com SDRA ou HP em todos os dias analisados (Fig.20A). Na mensuração dos tecidos normalmente aerados observamos nos camundongos infectados a diminuição da aeração pulmonar quando comparado aos animais não infectados em todos os dias analisados. Entretanto, no 5ºdpi as vias aéreas estavam íntegras quando comparadas aos animais no 7ºdpi, que apresentavam baixa aeração pulmonar. Já no 14ºdpi, o pulmão dos animais com hiperparasitemia estavam com as vias aéreas mais conservadas, demonstrando a melhora pulmonar (Fig. 20B). Camundongos com SDRA no 5ºdpi não demonstraram diferenças nos tecidos pobremente aerado quando comparados aos animais não infectados. Porém, os animais com SDRA no 7ºdpi apresentam diminuição dos tecidos pobremente aerados quando comparados aos animais não infectados, com animais SDRA no 5ºdpi ou com hiperparasitemia. Nos

resultados do 14ºdpi podemos observar maior aeração pulmonar quando comparada aos animais no 7ºdpi com HP (Fig. 20C). Camundongos não infectados apresentaram pequenas áreas de tecido não aerado, e após a infecção, ocorreu o aumento de tecidos não aerados em todos os dias analisados quando comparado ao controle, denotadas pela presença de edema, hemorragias e congestão pulmonares nestes animais (Fig. 20D). A sobreposição dos *ranges* pode ser observado na figura 20E.

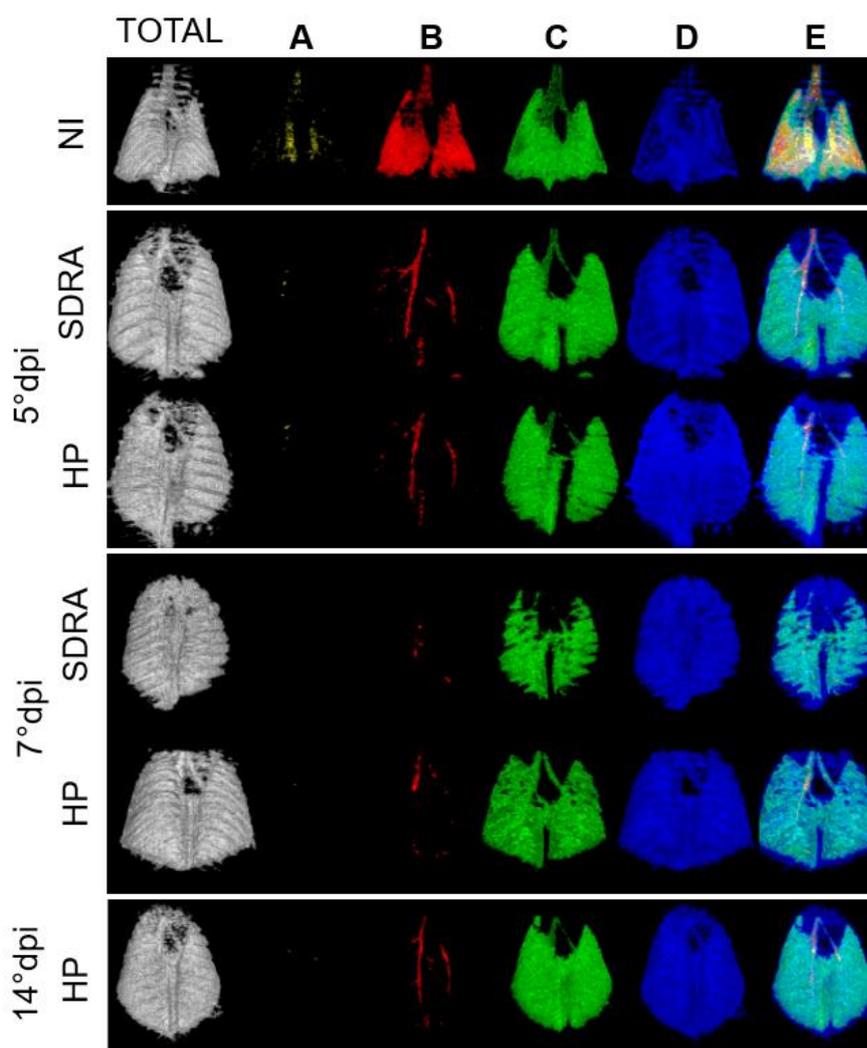


Figura 20 – Segmentação 3D utilizada na análise aeração pulmonar durante a síndrome do desconforto respiratório agudo associado a malária experimental pela tomografia computadorizada. A avaliação da aeração pulmonar pela tomografia computadorizada foi realizada em camundongos DBA/2 após 5º, 7º e 14º dias de infecção com *Plasmodium berghei* ANKA. (A) Tecidos hiperinflados, (B) tecidos normalmente aerados, (C) tecidos pobremente aerados, (D) tecidos não aerados, (E) merge das sobreposições dos *ranges*. Imagens representativas de 4 experimentos independentes, onde n = 7-14/experimento. NI=Não infectado, SDR= Síndrome do desconforto respiratório agudo, HP= Hiperparasitemia, dpi= dias pós-infecção.

Os pontos de corte da HU definidos na aeração são amplamente utilizados para avaliar a quantidade de ar no interior dos pulmões e correlacionados com o desenvolvimento da atelectasia durante a SDRA (CRESSONI et al., 2008). Estudos anteriores demonstraram por imagem que os tecidos pulmonares não aerados (0HU a 100HU) estão correlacionados com a gravidade da hipoxemia e com o edema observado nos pacientes com SDRA, onde foi observado infiltrado bilateral difuso predominantemente na base pulmonar (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018).

4.2.2 Aumento do tecido pulmonar não aerado pela tomografia computadorizada está associado com os parâmetros respiratórios durante a síndrome do desconforto respiratório agudo associado a malária experimental

Os parâmetros respiratórios durante a SDRA associada a malária experimental estão relacionados com a dificuldade nas trocas gasosas pelo aumento de permeabilidade vascular e processo inflamatório (EPIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014). No 5° dpi não houve diferença significativa entre a correlação dos dados dos parâmetros respiratórios e CT, possivelmente porque não há diferenças destes parâmetros entre os animais não infectados e infectados neste dia de infecção. Portanto, realizamos a regressão linear para analisar a associação dos critérios preditivos no 7° dpi com o aumento do tecido não aerado pela TC (Fig. 21). Camundongos com SDRA apresentaram: correlação negativa forte (Fig. 21A) entre a diminuição da frequência respiratória com o aumento de tecido não aerado (R^2 0,88 $p < 0,005$); correlação negativa forte (Fig. 21B) entre a diminuição do volume de ventilação e aumento de tecidos não aerados (R^2 0,89 $p < 0,004$); correlação negativa moderada (Fig. 21C) entre a diminuição do volume tidal com o aumento do tecido não aerado (R^2 0,53 $p < 0,01$); correlação positiva forte (Fig. 21D) entre o aumento da pausa respiratória e a presença de tecidos não aerados (R^2 0,94 $p < 0,001$); correlação positiva forte (Fig. 21E) entre o aumento do tempo de expiração com a presença do tecido não aerado (R^2 0,95 $p < 0,001$); correlação positiva forte (Fig. 21F) entre o aumento do tempo de inspiração com o aumento da atelectasia (R^2 0,87 $p < 0,006$).

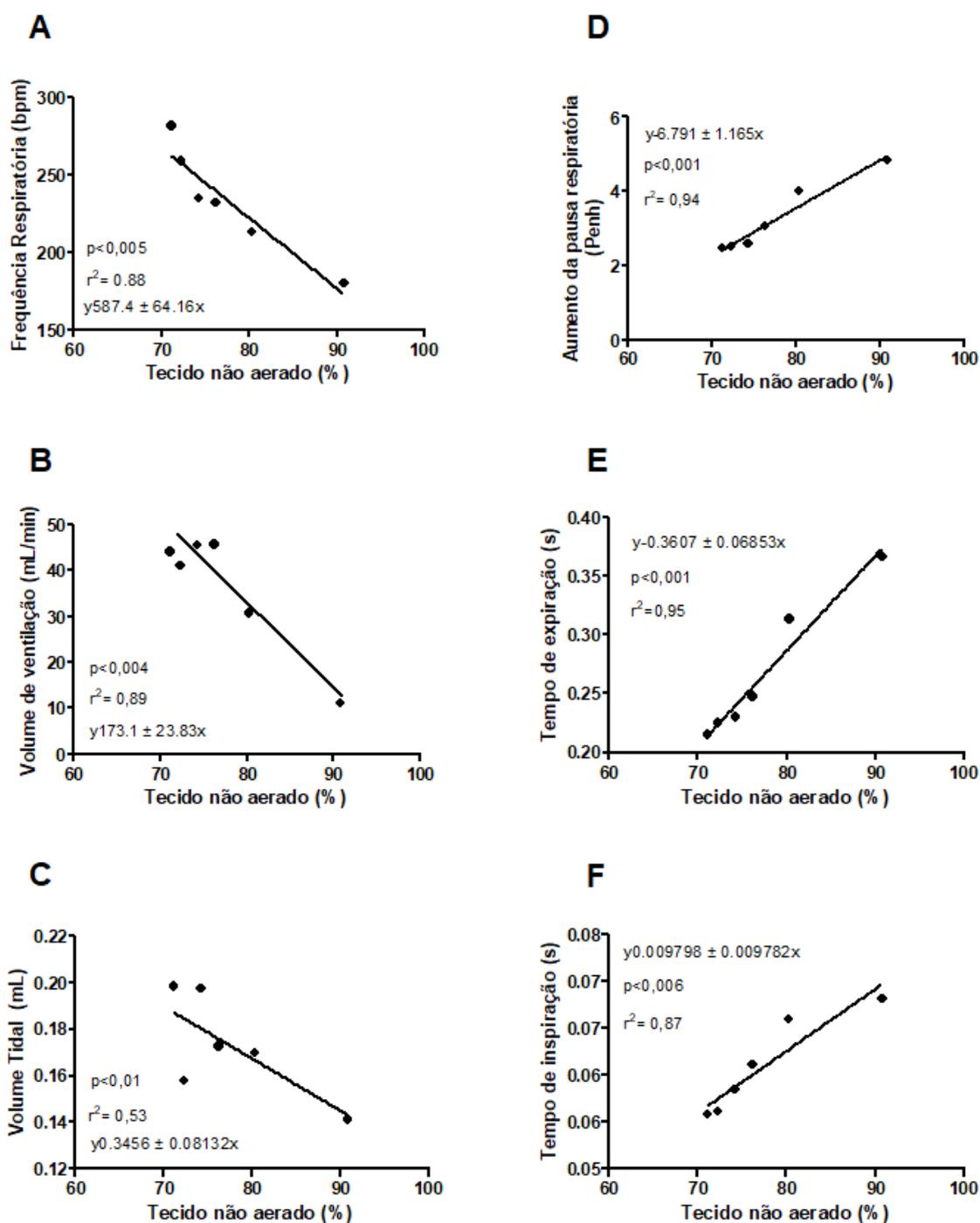


Figura 21 - Correlações entre os parâmetros respiratórios e o tecido pulmonar não aerado observado pela tomografia computadorizada durante a síndrome do desconforto respiratório agudo associada a malária. Camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA que desenvolveram a síndrome do desconforto respiratório agudo no 7º dpi apresentam: **(A)** Correlação negativa forte entre a diminuição da frequência respiratória com o aumento de tecido não aerado CT. **(B)** Correlação negativa moderada entre o volume por minuto de ventilação com o aumento de tecido não aerado CT. **(C)** Correlação

negativa moderada entre o volume tidal com o aumento de tecido não aerado CT. **(D)** Correlação positiva forte entre o aumento da pausa respiratória com a presença de tecido não aerado CT. **(E)** Correlação positiva forte entre o tempo de expiração com aumento de tecido não aerado CT. **(F)** Correlação positiva forte entre o tempo de inspiração com o aumento de tecido não aerado CT. N=6. Dados apresentados como média \pm SD. Resultados representativos de 2 experimentos isolados. Regressão linear (R^2).

A análise da aeração pulmonar na inspiração/expiração final durante a SDRA promoveu o aumento de tecidos pulmonares não aerado demonstrando injúria severa e risco 3 vezes superior de lesão pulmonar e atelectasia. Tecidos pobremente aerados e não aerados são descritos no desenvolvimento da SDRA, através do prolongamento da expiração final (KARMRODT et al., 2006; AGUIRRE-BERMEIO et al., 2016).

A SDRA promove a deficiência nas trocas gasosas com alteração dos parâmetros respiratórios, como o aumento da pausa respiratória e a diminuição da frequência respiratória (ORTOLAN et al., 2014), aumento da pausa inspiratória (AGUIRRE-BERMEIO et al., 2016) e do tempo de inspiração (MERCAT et al., 2001), com o objetivo de eliminar o CO_2 e promover a homeostase pulmonar.

A deficiência nas trocas gasosas em modelos experimentais de SDRA, podem ser mensurados através da CT com alta sensibilidade, identificando as lesões precocemente e a gravidade da doença, que são correlacionadas com o grau de hipoxemia (CRESSONI et al., 2008). Durante a SDRA baixos valores de PaO_2 estão relacionados como aumento de massa de atelectasia e altos valores de shunt estão correlacionados com o aumento da gravidade da lesão pulmonar pela CT (WOLF et al., 2015). A mensuração da oxigenação pulmonar é importante na avaliação da gravidade da SDRA e estão correlacionados com o aumento de tecidos não aerados e atelectasia (MARKSTALLER et al., 2003).

4.3 Diminuição da perfusão pulmonar nos camundongos com síndrome do desconforto respiratório agudo.

A cintilografia de perfusão pulmonar com partículas biodegradáveis de macro agregado de albumina associado ao tecnésio 99 (MAA Tc-99m) é uma ferramenta de diagnóstico importante na avaliação da perfusão regional pulmonar. O MAA Tc-99m pode ser usado para uma variedade de indicações clínicas como por exemplo: tromboembolismo pulmonar, enfisema pulmonar, estenose da artéria pulmonar, síndrome hepatopulmonar, entre outros (OLIVEIRA et al., 2006; KASHEFI; KUO; SHELTON, 2011).

Os nossos resultados demonstraram que 7° dia após a infecção com *Plasmodium berghei* ANKA os camundongos que desenvolvem a SDRA, apresentam diminuição na perfusão pulmonar quando comparado ao grupo HP ($p < 0,01$). No corte transversal é possível observar que praticamente não há marcação com o MAA Tc-99m, o que demonstra pouca perfusão devido a efusão pleural e o colapamento dos alveolos (Fig.22). A marcação presente nos camundongos com SDRA se concentram no foco da lesão, provavelmente devido ao aumento da permeabilidade vascular e ao acúmulo de sangue no local da lesão.

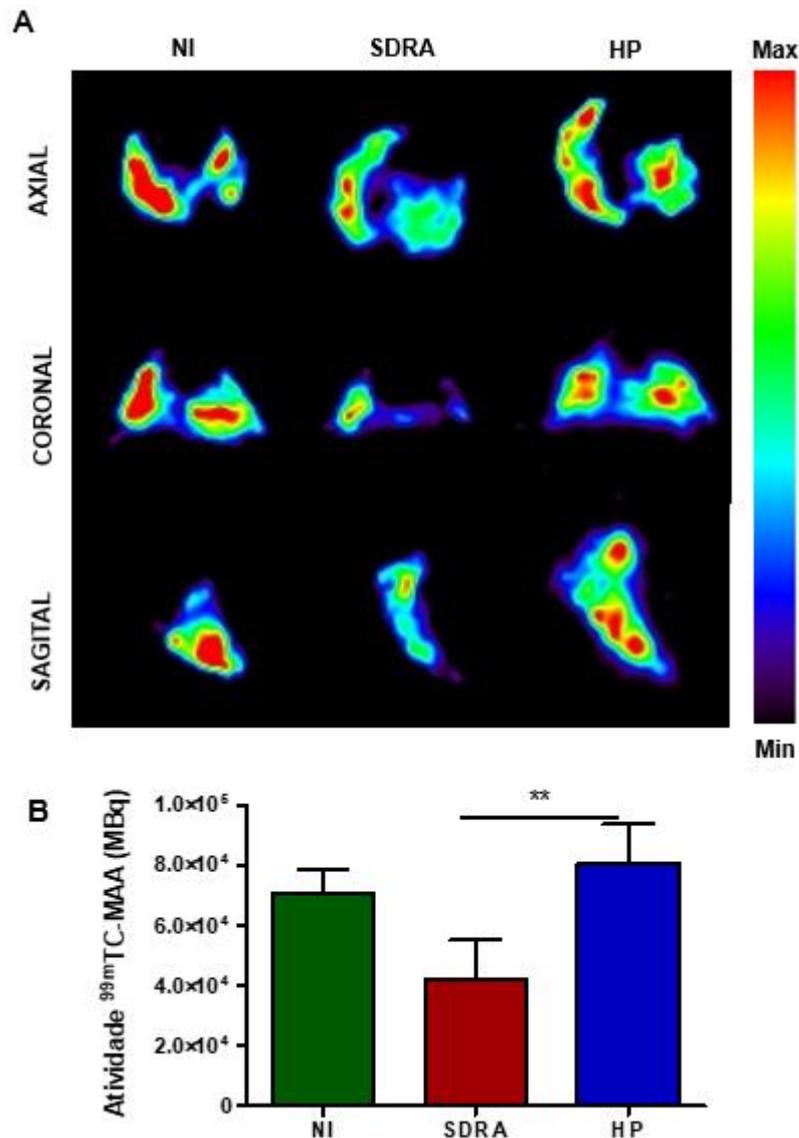


Figura 22 - Diminuição da atividade de ^{99m}Tc -MAA durante a perfusão pulmonar no 7^o dpi durante a SDRA associada a malária. (A) Foram observados em camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA com SDRA pouca perfusão (azul claro) em todos os cortes analisados o que demonstra a insuficiência respiratória, em relação aos animais não infectados, pois estes apresentaram maiores concentrações de ^{99m}Tc -MAA (áreas vermelhas). (B) Quantificação da atividade de ^{99m}Tc -MAA. Imagens representativas de 2 experimentos isolados, onde $n = 7-10$ /experimento. Kruskal-Wallis. ** $p < 0,01$. NI: Não Infectados, SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo, HP: hiperparasitemia.

A compreensão dos conceitos a respeito da mecânica respiratória, principalmente da ventilação e perfusão, são de suma importância para compreender a fisiopatologia pulmonar na SDRA (FREITAS, 2007). Portanto, ventilação é o conjunto de movimentos físicos de entrada e saída de ar dos pulmões por minuto e perfusão refere-se ao fluxo sanguíneo pulmonar disponível para a troca gasosa

(ISABEL et al., 2010).

A perfusão pulmonar durante a SDRA está reduzida nas áreas pobremente aeradas, sendo possível observar acúmulo no foco da lesão, provavelmente devido ao aumento da permeabilidade vascular e maior biodisponibilidade de sangue no local contendo o radiofármaco (CHIUMELLO et al., 2013), mas nem sempre as alterações pulmonares reveladas por CT correlacionam-se com o SPECT. Durante o câncer de pulmão ocorre a diminuição acentuada de aeração e intensas áreas de atenuação de vidro fosco, entretanto pelo SPECT, o tecido se manteve preservado (DAVISON et al., 2013).

A perfusão pulmonar em pacientes com SDRA demonstrou a marcação mais acentuada na base pulmonar devido a diminuição da barreira endotelial (DAKIN et al., 2012). O estudo da distribuição regional da perfusão é importante para mensurar a oxigenação e ocorre a diminuição do radiofármaco em áreas pobremente aeradas e não dependentes durante a SDRA (PELOSI; DE ABREU, 2015).

O estudo da perfusão e da ventilação pulmonar é essencial para a melhor compreensão da função pulmonar durante a SDRA, sendo possível observar menor marcação em pacientes graves demonstrando a insuficiência pulmonar (CHRISTMANN WAWRZENIAK et al., 2018)

Portanto, nós acreditamos que a tomografia computadorizada poderá ser uma importante ferramenta para diagnóstico da SRDA associada a malária, preconizando assim o acompanhamento terapêutico mais efetivo, que diminuam a mortalidade destes pacientes.

4.4 Caracterização das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

Atualmente, há muitos trabalhos desenvolvidos para a caracterização de células endoteliais humanas e murinas. Diferentes técnicas, como o uso da microscopia de contraste de fase, citometria de fluxo, imunofluorescência e ensaio de absorção de lipoproteínas como o LDL podem ser utilizadas. Entretanto, apenas utilizando um conjunto de marcações e anticorpos pode, de fato, caracterizar as células endoteliais (LAMPUGNANI; DEJANA, 1997; COMHAIR et al., 2012).

Os ensaios de imunofluorescência para designar a pureza do isolamento das CEPP-DBA/2 demonstraram que houve a marcação positiva para todos os anticorpos específicos pesquisados, como o anti-vWF, anti-eNOS, anti-CD31, anti-ACE, anti-CD62E e o reagente de ULEX (Fig.23).

Estes resultados demonstraram que as células isoladas dos pulmões de camundongos DBA/2 são verdadeiramente células endoteliais e que mantêm características típicas de células endoteliais em culturas celulares. Além disso, resultados obtidos em nosso laboratório, pela Dra. Luana dos Santos Ortolan, demonstraram que as mesmas células apresentaram expressões para ICAM, VCAM, CD31, VE-caderina, CD36 e endogлина, pela técnica de citometria de fluxo (dados não publicados), validando os resultados destes ensaios, pois as CEPP-DBA/2 apresentaram características singulares de células endoteliais.

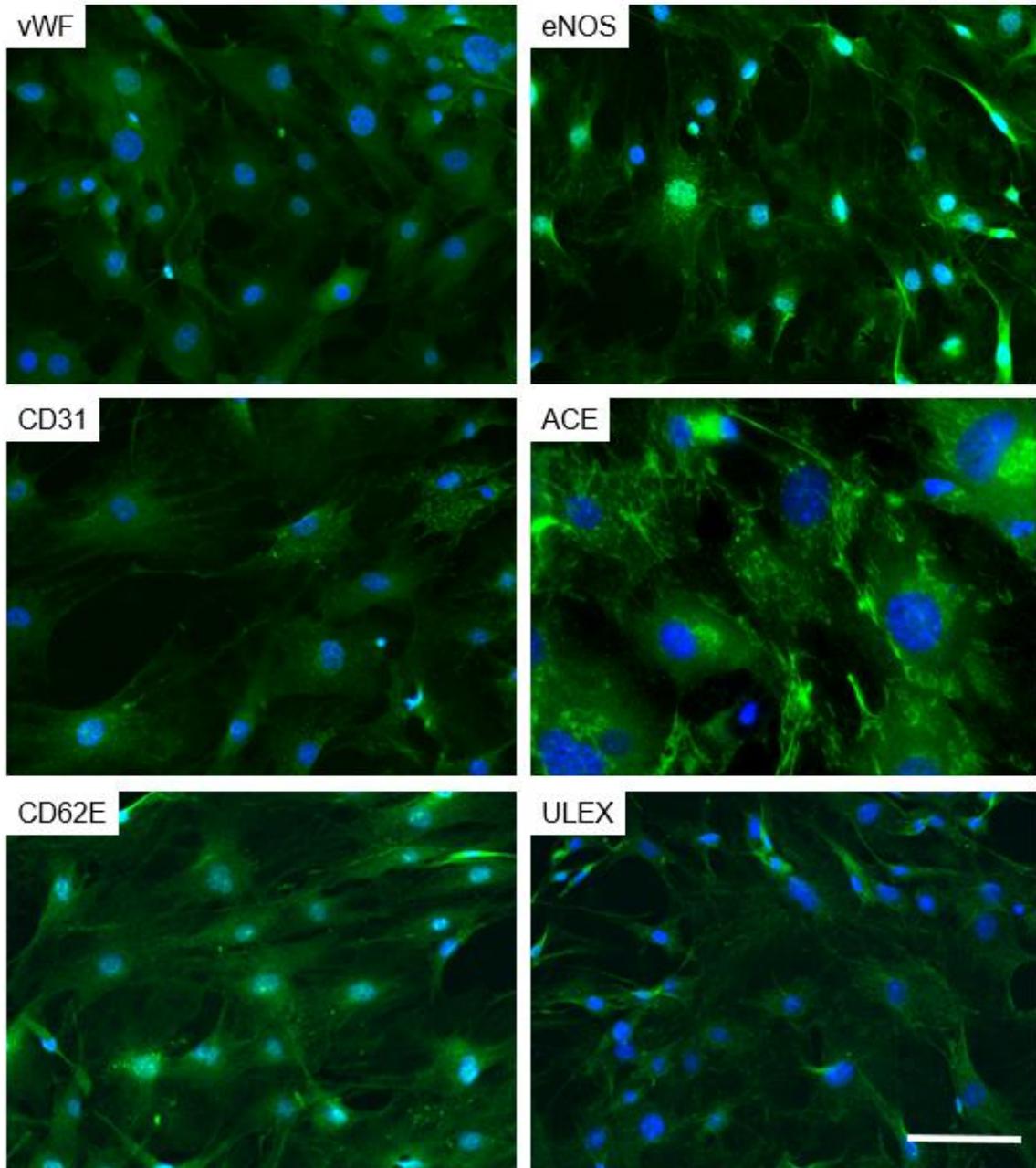


Figura 23 - Identificação das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 por imunofluorescência. Foram utilizados anticorpos anti-vWF, anti-eNOS, anti-CD31, anti-Ace, anti-62E, seguidos do anticorpo secundário goat anti-rabbit Alexa Fluor 488, na concentração 1:400 e o reagente de Ullex. Núcleos celulares foram marcados com Hoechst (azul). Todas as marcações foram positivas o que demonstra a pureza do isolamento das células endoteliais pulmonares primárias. Barra de escala: 50 μ m.

4.5 EP-PbA promovem o aumento dos espaços interendoteliais em monocamada de CEPP-DBA/2

Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa da Me. Daniela Debone identificaram que o EP-PbA promove modificações na conformação dos microfilamentos de actina (por faloidina) e alteração da abertura da junção interendoteliais em CEPP-DBA/2 (DEBONE et al., 2017). Entretanto, não sabíamos se o contato direto dos EP-PbA com as células endoteliais ou se os metabólitos provenientes dos parasitas causariam estas alterações. Por isso, os experimentos de imunofluorescência, que serão descritos a seguir, tiveram como objetivo investigar as possíveis alterações nos microfilamentos de actina e na abertura das junções interendoteliais em CEPP-DBA/2, causadas pelo contato indireto com eritrócitos parasitados em esquizontes de *P. berghei* ANKA (iEP-PbA), comparados com NE, ENP e EP-PbA. Observamos que apenas o estímulo direto com EP-PbA promoveu alterações na morfologia celular e abertura da junção celular (EP-PbA vs iEP-PbA $p < 0,001$) (Fig.24). Na quantificação da abertura das junções interendoteliais (Fig.24E), observa-se que as CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA apresentaram porcentagens das áreas significativamente maiores que as áreas das células NE, ENP ou iEP-PbA (EP-PbA vs NE, ENP ou iEP-PbA $p < 0,001$). Além disso, não houve diferença significativa entre as porcentagens das áreas de NE, ENP ou iEP-PbA. Ainda, pode-se observar que as células estimuladas com EP-PbA apresentaram aberturas entre as junções interendoteliais de cerca de 3 vezes mais elevadas, quando comparadas com as células NE, ENP ou iEP-PbA, que se apresentaram, de forma muito semelhante, com perturbações nas junções interendoteliais praticamente ausentes.

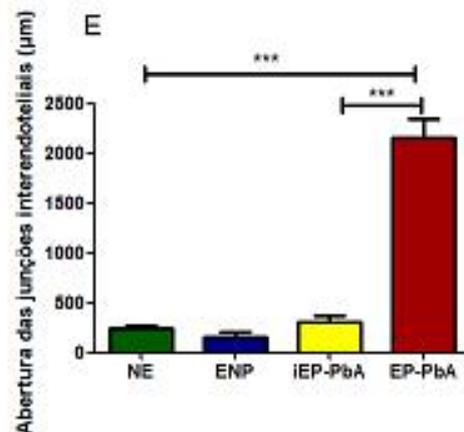
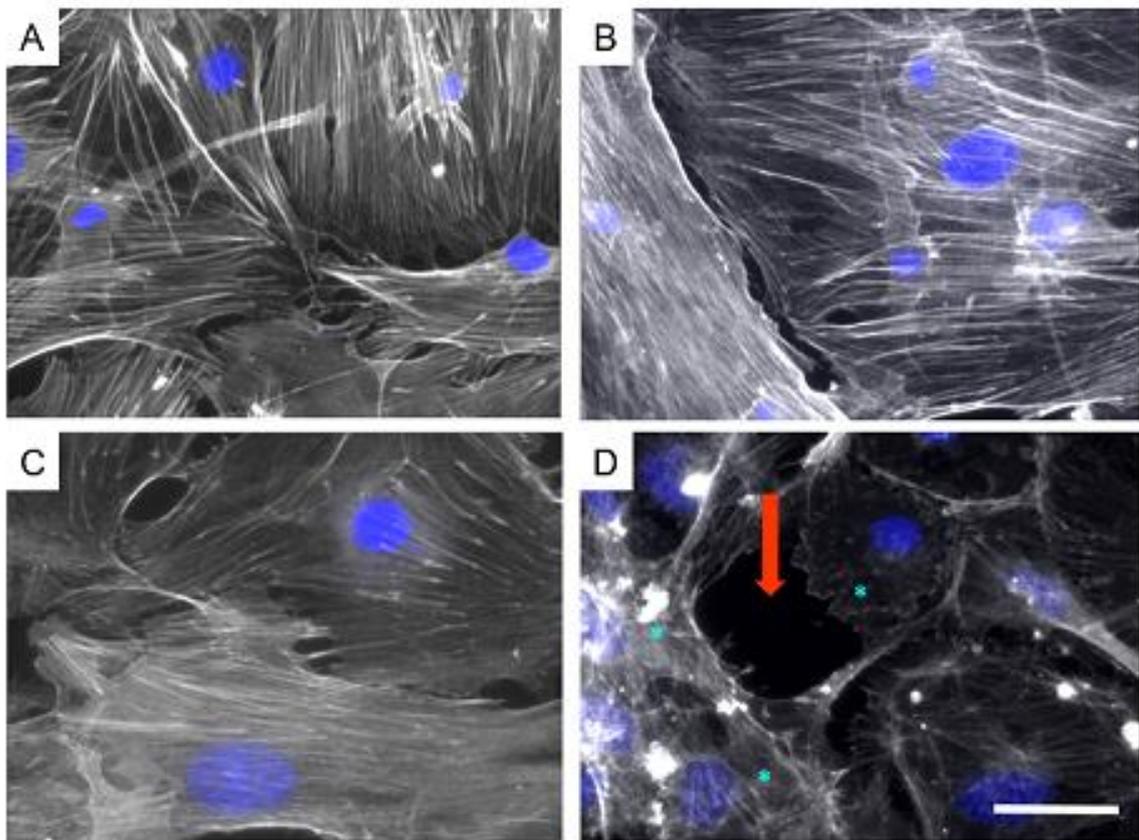


Figura 24 - EP-PbA provocam alterações na abertura das junções interendoteliais das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2. As células NE (A), ENP (B) e iEP-PbA (C) apresentaram microfilamentos de actina íntegros (seta amarela), entretanto, apenas após o contato direto com EP-PbA (D) promoveu desarranjo destes filamentos (*) e aumento das aberturas interendoteliais (seta vermelha). A actina foi marcada com Texas Red Phalloidina (1:200) e os núcleos das células endoteliais foram marcados em azul com Hoechst (1:1000). Quantificação da abertura das junções interendoteliais (E). Dados apresentados como média \pm erro padrão. Resultados representativos de dois experimentos independentes. Kruskal-Wallis. (n= 15 a 20 imagens/por grupo. *** $p < 0,001$. NE: não estimuladas, ENP: eritrócitos não parasitados, iEP-PbA: contato indireto com eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA, EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; Barra de escala: 50 μ m.

O nosso grupo de pesquisa publicou um estudo utilizando as mesmas células endoteliais (CEPP-DBA/2) estimuladas com lisado de *P. berghei* ANKA e foi observado que este promoveu perturbações nos microfilamentos de actina e nas junções interendoteliais (PEREIRA et al., 2016).

GALLEGO e colaboradores demonstraram que lisados de eritrócitos parasitados com *P. Falciparum* também promoveram alterações no citoesqueleto e a abertura das junções interendoteliais induzindo a disfunção endotelial cerebral. Apesar deste estudo ter sido realizado com eritrócitos fragmentados e o nosso com eritrócitos íntegros, o mesmo demonstrou resultados muito semelhantes aos resultados aqui apresentados (GALLEGO-DELGADO et al., 2016) .

Além disso, nossos resultados foram semelhantes ao estudo *in vitro* que demonstrou que a citoadesão de *P. falciparum*, em células endoteliais pulmonares humanas, gerou a disfunção da barreira endotelial, através da contração celular e alteração de junções interendoteliais, provocando o aumento da permeabilidade endotelial (TAOUFIQ et al., 2008).

4.6 EP-PbA provocam o aumento da permeabilidade de células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2.

Nossos resultados demonstraram o aumento da abertura entre as junções interendoteliais foi causado pelo contato direto e adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes do *P. berghei* ANKA, nas CEPP-DBA/2. Assim, o aumento da permeabilidade foi validado, por análise de concentração do corante azul de Evans, onde as CEPP-DBA/2 foram aderidas em membrana semi-permeável (compartimento superior), em sistema de Transwell®. Estes ensaios demonstraram que o estímulo direto com EP-PbA provocou a passagem elevada de azul de Evans entre as conexões celulares, através dos poros da membrana permeável para o compartimento inferior (Fig.25). Observou-se que o fluxo de azul de Evans nestas células foi superior em relação aos grupos NE, ENP e iEP-PbA (EP-PbA vs NE ou ENP $p > 0,05$). Apenas o estímulo direto com EP-PbA nas CEPP-DBA/2 promoveu o aumento da permeabilidade visto que o contato indireto com iEP-PbA teve os níveis de azul de Evans semelhantes aos encontrados no grupo NE e ENP (EP-PbA vs iEP-PbA $p < 0,05$). A concentração de azul de Evans, que atravessou a monocamada endotelial,

referente à EP-PbA foi de 0,037 mg/mL, concentração significativamente maior que as observadas em NE (0,022 mg/mL) e em ENP (0,021 mg/mL).

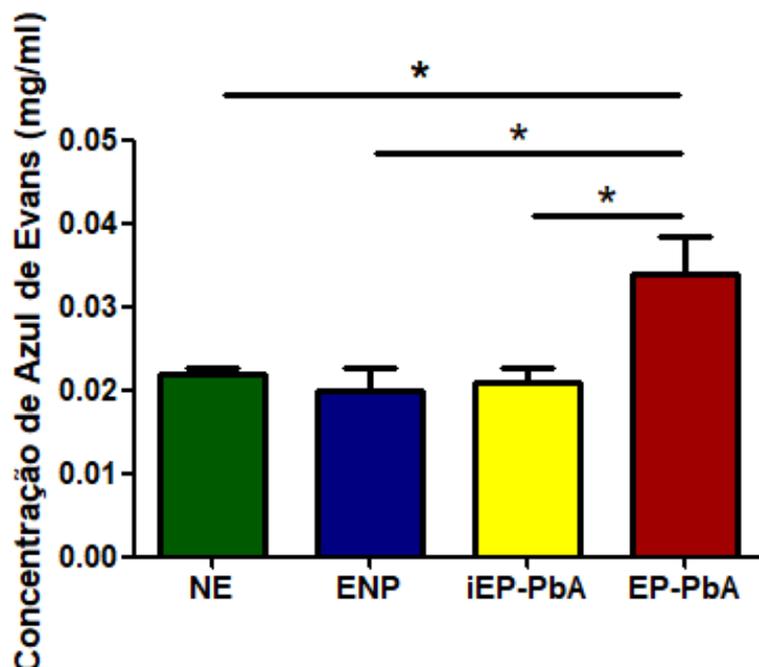


Figura 25 - Contato direto com EP-PbA provoca aumento da permeabilidade das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 pelo ensaio de Azul de Evans. Dados apresentados como média \pm erro padrão. *Kruskal-Wallis*. $n = 3$ a 4 por grupo. Resultados representativos de 2 experimentos. * $p < 0,05$. NE: não estimuladas, ENP: eritrócitos não parasitados, iEP-PbA: contato indireto com eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA, EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA.

Taoufiq e colaboradores identificaram também por sistema de Transwell que a exposição com eritrócitos infectados com *P. falciparum* provocava o rompimento e apoptose de células endoteliais pulmonares humanas em monocamadas (TAOUFIQ et al., 2008).

Dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que EP-PbA também induziram a apoptose em CEPP-DBA/2, quando estimuladas por 24 horas (Sercundes et al., dados não publicados). Entretanto, o estímulo de apenas uma hora de EP-PbA, mesmo tempo de exposição de todos os experimentos realizados neste trabalho, não alterou a viabilidade celular ou provocou apoptose destas células (PEREIRA et al., 2016). Portanto, demonstramos, mais uma vez que apenas o contato direto com o EP-PbA na microvasculatura pulmonar murina atua como um fator crítico para o aumento da permeabilidade vascular.

4.7 Caracterização das junções interendoteliais das células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

As células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 foram marcadas com os anticorpos para VE-caderina, claudina 5, ocludina, JAM-B, ZO-1, conexina 43. Os resultados observados (Fig.26) demonstram que a houve a marcação por todos os anticorpos para as junções interendoteliais.

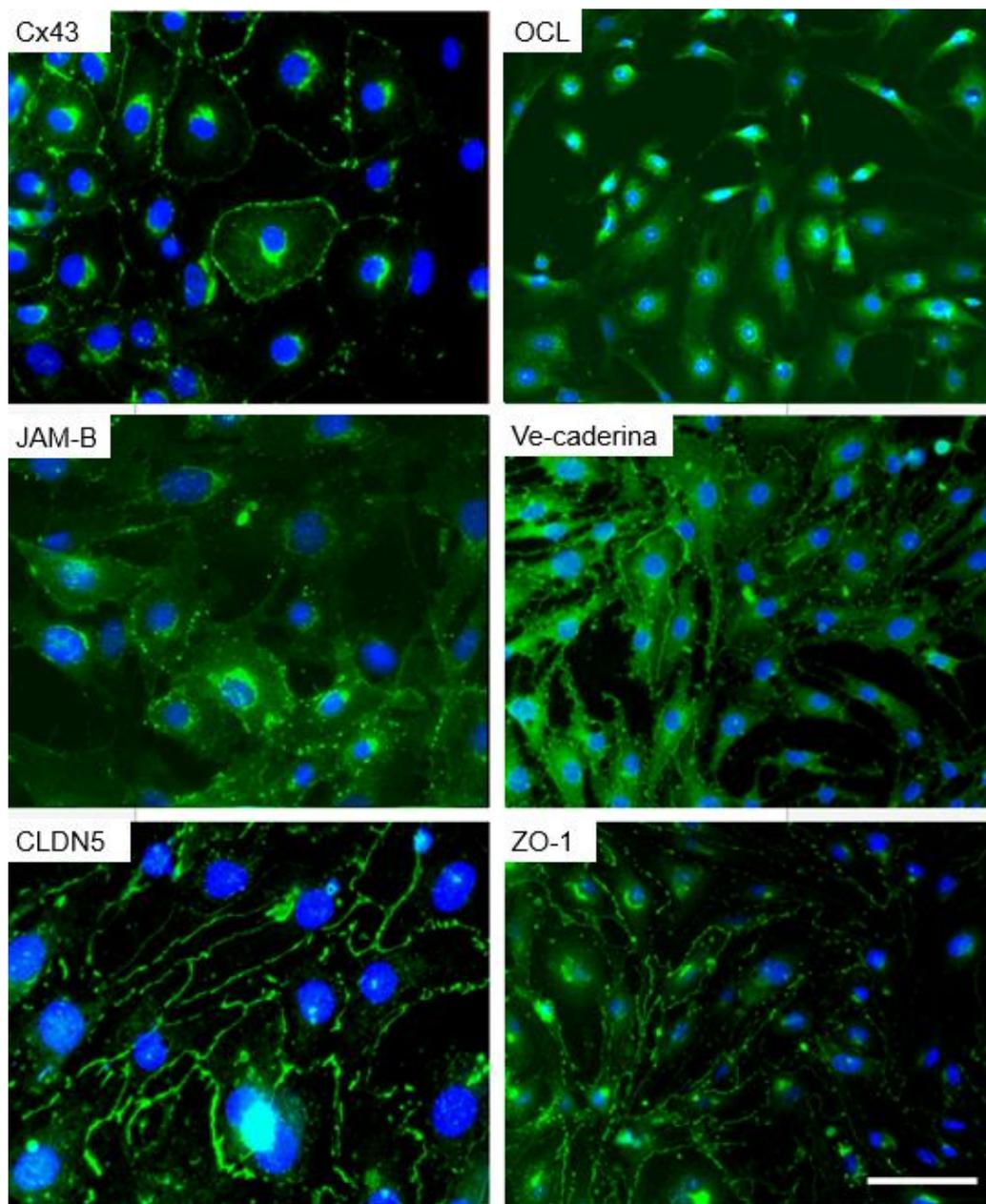


Figura 26 - Marcações das junções interendoteliais nas células endoteliais pulmonares primárias de camundongos da linhagem DBA/2 por imunofluorescência. Foi utilizado em todos os experimentos o anticorpo secundário Goat anti rabbit Alexa Fluor 488 (verde), na concentração 1:400. Núcleos celulares foram marcados com Hoechst (azul). Barra de escala: 50 μ m.

4.8 EP-PbA induzem a diminuição da Conexina 43 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

A Cx43 é predominante no endotélio pulmonar e fundamental para manter a integridade vascular do pulmão e são reguladas pela alteração do pH intracelular e das concentrações de cálcio e modificações pós-traducionais como o aumento da expressão da proteína quinase A (PKA), resultando na fosforilação da Cx43.

Nas células endoteliais pulmonares primárias estimuladas com EP-PbA foi avaliada a CX43, onde observamos marcação mais intensa em células não estimuladas ou estimulados com ENP, quando comparadas com as células estimuladas com EP-PbA (Fig.27A). Foi realizada a quantificação da expressão da fluorescência celular total corrigida, por análise de imagem e, foi observado diminuição da fluorescência no grupo EP-PbA em comparação com o grupo NE (NE vs EP-PbA $p < 0,05$) (Fig.27B) e diminuição da área ocupada pela marcação (NE vs EP-PbA $p < 0,001$) (Fig.27C). Além disso foi observado diminuição da expressão da proteína CX43 nas CEPP-DBA/2 estimuladas pelo EP-PbA em relação ao NE por WB (Fig.27D).

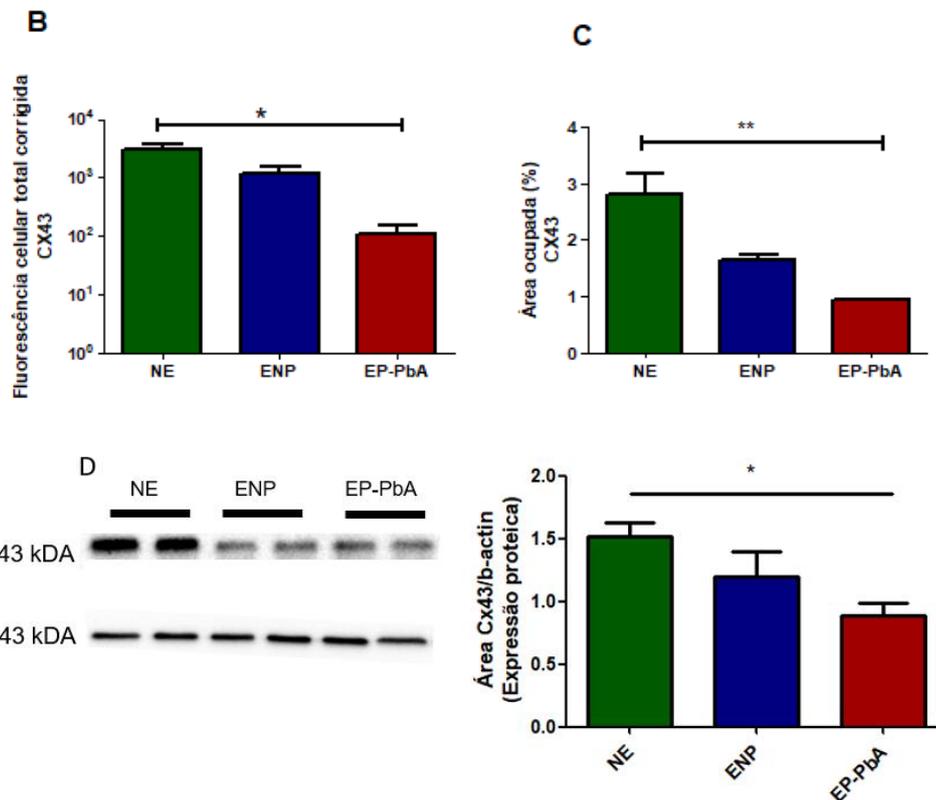
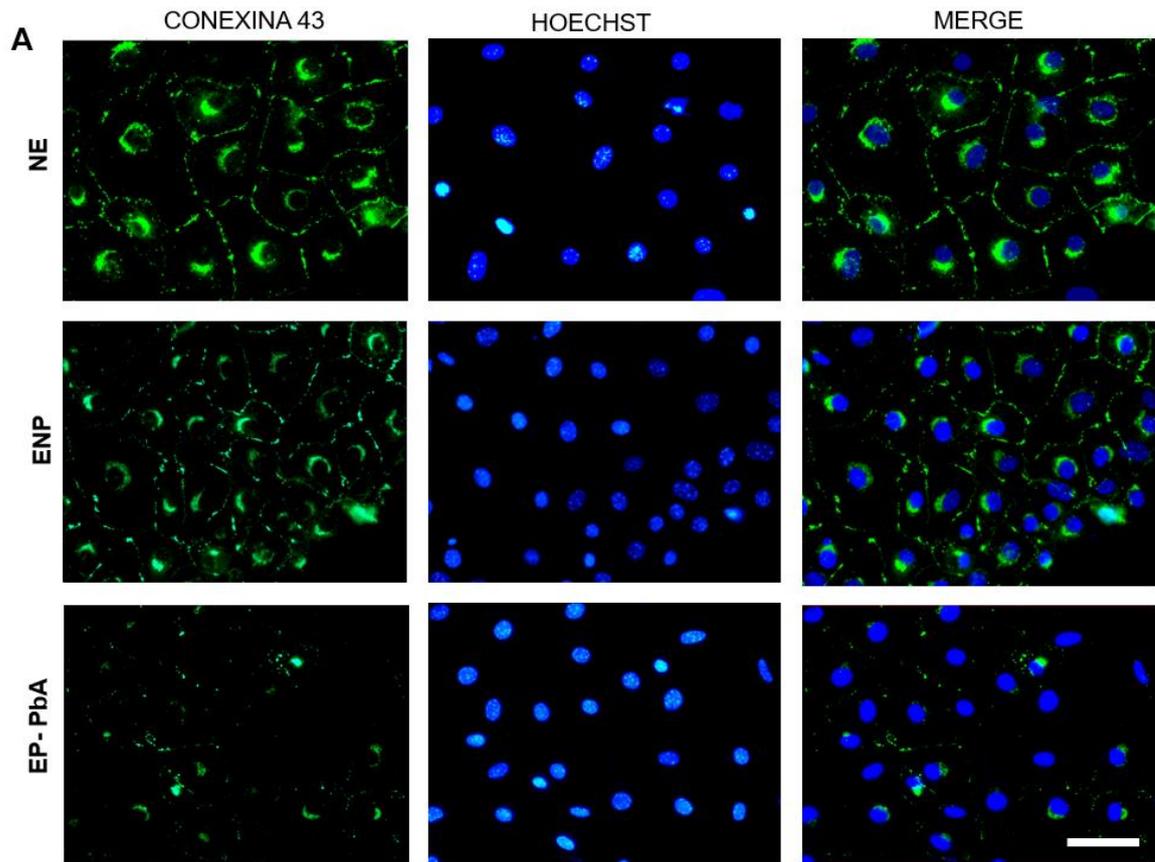


Figura 27 - EP-PbA induzem a diminuição da Conexina 43 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 por imunofluorescência (A-C) e por Western blot (D). (A) Foram

utilizados anticorpos anti-conexina 43 e secundário Goat anti rabbit Alexa Fluor 488 (verde) e os núcleos celulares marcados com Hoechst (azul); N=4 por grupo. Imagens representativas de 3 experimentos independentes. (B) quantificação da fluorescência celular total corrigida e (C) área ocupada pela marcação da conexina 43. (D) para quantificação da proteína CX43 (43kDA)/ β -actina. Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. NE = não estimulado, ENP = eritrócito não parasitado, EP-PbA= eritrócito parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA. Barra de escala: 50 μ m.

Em ensaios *in vitro* a inibição da conexina 43 em células endoteliais da microvasculatura pulmonar gerou a hiperpermeabilidade da junção comunicante, e a modulação da Cx43 pode ser realizada via NF κ -B. *In vivo*, baixos níveis de Cx43 são modulados pela expressão do EPCR durante a SDRA (KANDASAMY et al., 2015). A proteína kinase A (PKA) promoveu a fosforilação da serina 368 do domínio C terminal da Cx43 controlando a abertura dos hemicanais, e o domínio N terminal causou o fechamento da JC (ROSADO et al., 2012).

O TNF- α e a trombina associada ao EPCR promoveram a redução da expressão da Cx43 em células endoteliais da microvasculatura pulmonar pela fosforilação da tirosina induzindo o desarranjo na barreira endotelial. Ainda, o *knockdown* da Cx43 diminui a ação da trombina na permeabilidade vascular e fosforilação da miosina de cadeia leve, contribuindo para a regulação da JC (OKAMOTO et al., 2017).

É interessante notar que resultados do nosso laboratório mostraram que DBA/2, que desenvolveram SDRA, apresentam níveis séricos altos de EPCR solúvel e maior expressão gênica e protéica do EPCR nos pulmões, quando comparados com animais não infectados ou que desenvolveram HP. Por outro lado, *in vitro*, EP-PbA não induziu aumento da expressão do EPCR nas células endoteliais pulmonares primárias, mas o uso de TNF recombinante sim. Ainda, mostramos que o EP-PbA incita a produção de TNF (Ortolan, et al, eBiomedicine, submetido). Portanto, podemos hipotetizar que o TNF produzido pelas células endoteliais, pode reduzir a expressão da Cx43 no nosso modelo experimental.

Em estudo com células endoteliais da microvasculatura pulmonar de coelhos, o TNF e IL-8 inibiram a expressão de Cx40, reduzindo a função das junções GAP, devido ao acúmulo de cálcio intracelular, levando ao aumento da permeabilidade vascular (ZHANG, 2010).

Não obstante, no nosso modelo experimental *in vivo* (camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA), nós mostramos que camundongos que desenvolvem a SDRA apresentaram níveis séricos mais elevados de KC (IL-8 de camundongos), quando comparados com animais não infectados ou que desenvolveram HP (SERCUNDES et al., 2016). Portanto, podemos inferir que a KC, além de recrutar neutrófilos, pode estar envolvida na redução da Cx43 e, conseqüentemente, no aumento da permeabilidade vascular, devido ao comprometimento das junções comunicantes. A Cx 43 modula a elasticidade pulmonar, animais Cx43-KO apresentam deficiências na mecânica pulmonar (HAEFLIGER et al., 2004).

4.9 EP-PbA promovem a diminuição da ocludina em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.

A ocludina é uma fosfoproteína que fornece a conexão com o citoesqueleto assegurando a alta resistência elétrica das monocamadas das células endoteliais e diminuição da permeabilidade paracelular (FELDMAN; MULLIN; RYAN, 2005).

Os nossos resultados demonstram que as CEPP-DBA/2 apresentaram marcação de ocludina mais intensa nas células não estimuladas ou estimuladas com ENP, quando comparadas com as células estimuladas com EP-PbA (Fig.28A). Foi realizada a quantificação da expressão (Fig.28B), por análise de imagem, e foi observado diminuição da fluorescência no grupo EP-PbA em comparação com o grupo NE (NE vs EP-PbA $p < 0,01$) e (Fig.28C) a área ocupada pela marcação (NE vs EP-PbA $p < 0,001$). Entretanto, EP-PbA não promoveu alteração da expressão da ocludina em CEPP-DBA/2 (Fig.28D) quando comparada ao grupo controle analisado por WB.

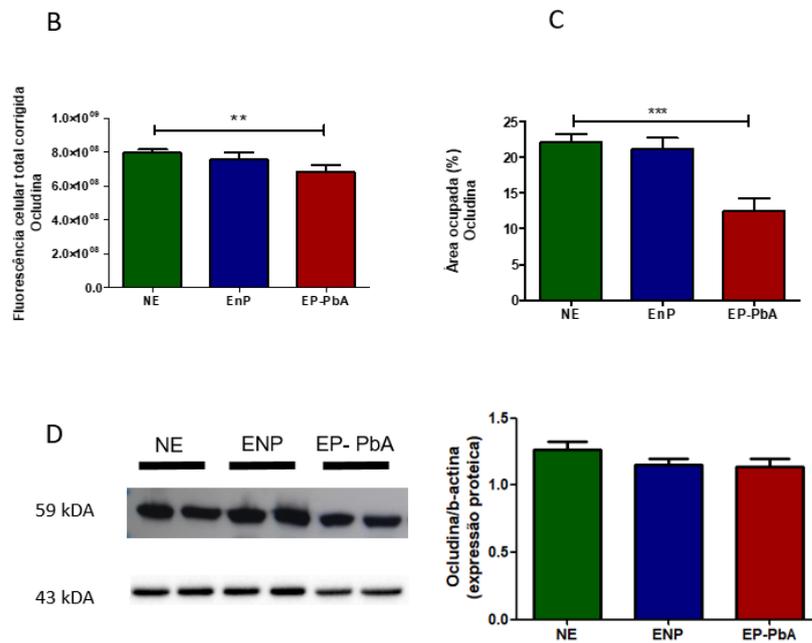
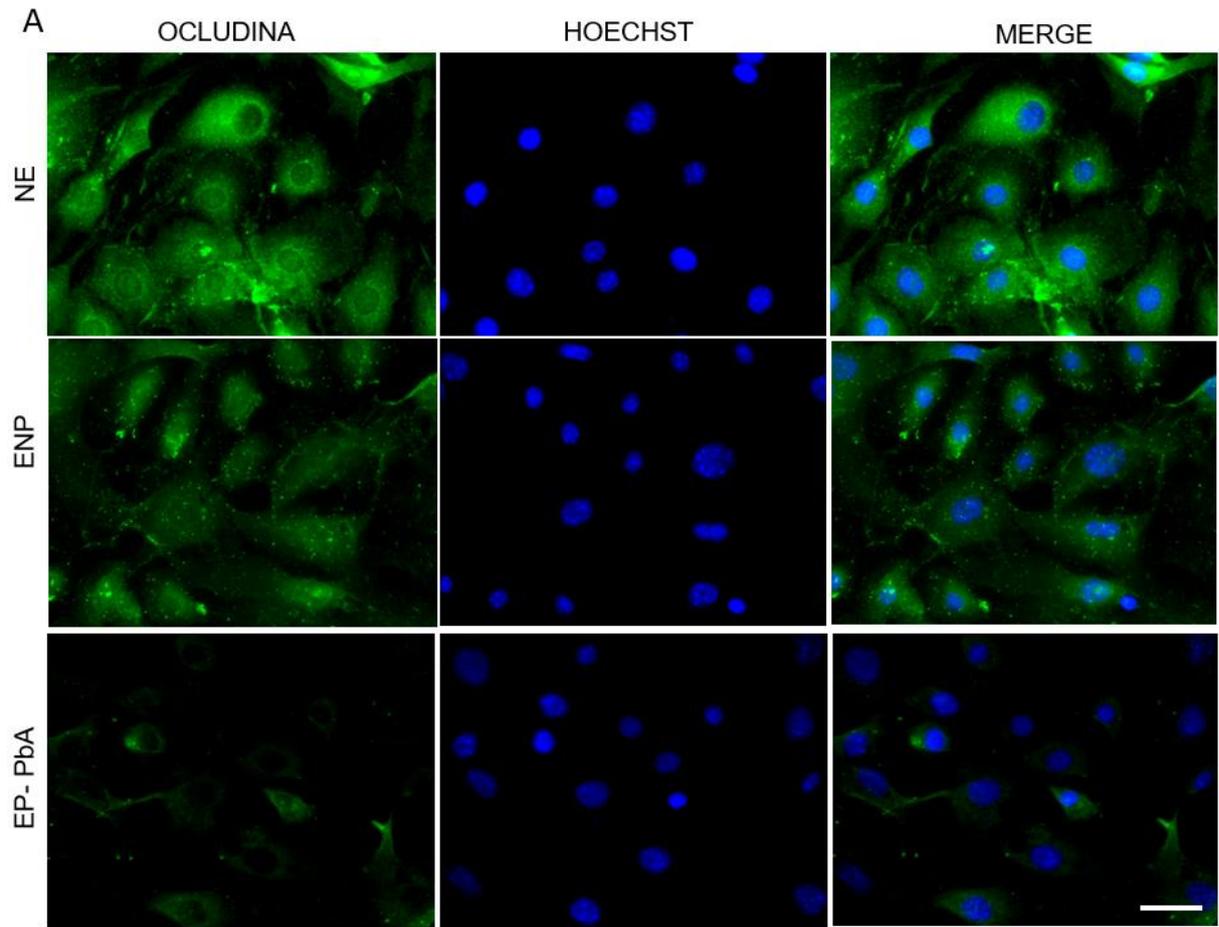


Figura 28 - EP-PbA promovem a diminuição da ocludina em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 por imunofluorescência (A-C). (A) Foram utilizados anticorpos anti-occludina e secundário goat anti rabbit Alexa Fluor 488 (verde) e os núcleos celulares marcados com Hoechst

(azul); N=4 por grupo. Imagens representativas de 3 experimentos isolados. (B) quantificação da fluorescência celular total corrigida e (C) área ocupada pela marcação da ocludina. (D) quantificação da proteína ocludina (59kDA)/ β -actina por Western Blot. Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. NE = não estimulado, ENP = eritrócito não parasitado, EP-PbA= eritrócito parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA. Barra de escala: 50 μ m.

O estudo com células endoteliais identificou que o estímulo de TNF- α e IL-1 β pelo período de 24 horas promoveu o aumento da permeabilidade, sendo o TNF- α mais potente. Observou-se que estes fatores inflamatórios promoveram a diminuição da ocludina e claudina 5 da superfície celular, translocando estas proteínas para o interior celular (AVELEIRA et al., 2010).

Foi reportado que a fosforilação da miosina de cadeia leve induzida, por TNF- α , promove a reorganização da junção de oclusão e endocitose da ocludina, porém, sem afetar a quantidade total da proteína, porém foi observado acúmulo da ocludina no citoplasma, demonstrado pelo ensaio de subfração celular (BUSCHMANN et al., 2013). O TNF- α também pode promover remoção do domínio C terminal da ocludina, aumentando o fluxo macromolecular não seletivo da barreira endotelial e, a neutralização do TNF- α pode restaurar a JO (BUSCHMANN et al., 2013).

A quimiocina inflamatória CCL2 é capaz de induzir a diminuição da ocludina na superfície da membrana, promovendo o aumento da permeabilidade vascular e diminuição da função de barreira (STAMATOVIC et al., 2009; PALOMINO; MARTI, 2015). A ativação da fosfatase A2 durante a resposta inflamatória induz o aumento da resistência elétrica transendotelial e internalização da ocludina (MANABE et al., 2017). A linhagem de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) tratadas com o inibidor da proteína tirosina fosfatase demonstrou o aumento da expressão da ocludina tanto por WB quanto por IF além da diminuição da permeabilidade celular relatando a influência de metaloproteinases na expressão da junção oclusiva (WACHTEL et al., 1999).

Portanto, a resposta inflamatória no pulmão é crucial na alteração da JO, sabemos que durante a SDRa associada a malária ocorre o influxo de neutrófilos e citocinas inflamatórias nos alvéolos e parênquima pulmonares (SERCUNDES et al., 2016), o que pode influenciar substancialmente a função da barreira endotelial.

A desregulação da JO em células endoteliais cerebrais promoveu a diminuição na expressão de ocludina e claudina, induzindo o aumento dos poros paracelulares e

da permeabilidade vascular (CHEN, 2008), fato este evidente no nosso modelo experimental tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

4.10 EP-PbA causam a diminuição da JAM-B em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

A molécula de adesão juncional 2 (JAM-B) é expressa em células endoteliais sendo uma proteína citoplasmática que forma associações com a ZO-1 e filamentos de actina, fundamentais para o controle da permeabilidade vascular endotelial (ZIHNI et al., 2016a)

Os nossos resultados demonstraram que após estímulo com EP-PbA, as CEPP-DBA/2 apresentaram diminuição da marcação de JAM-B em relação as células não estimuladas ou estimulados com ENP (Fig.29A). Foi realizada a quantificação da expressão (Fig.29B), por análise de imagem, e foi observado maior expressão da fluorescência no grupo NE em comparação com o grupo EP-PbA (NE vs EP-PbA $p < 0,001$) e (Fig.29C) da área ocupada pela marcação (NE vs EP-PbA $p < 0,001$). Além disso, foi observado maiores níveis proteicos (Fig.29D) nos grupos sem EP-PbA, sugerindo que o parasita interfere na abertura das junções de adesão.

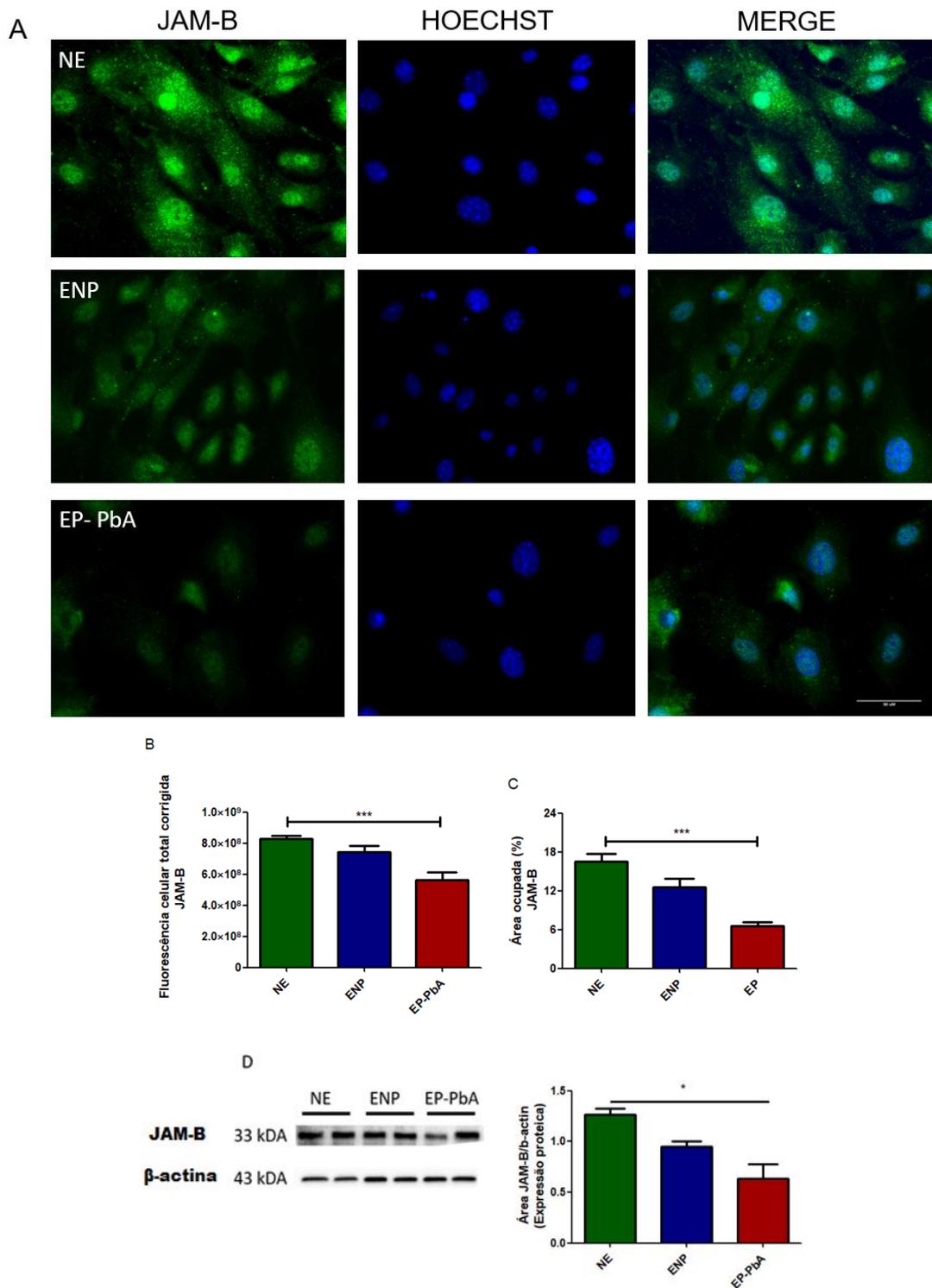


Figura 29 - EP-PbA causam a diminuição da JAM-B em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 por imunofluorescência (A-C) e por Western blot (D). (A) Foram utilizados

anticorpos anti-JAM-B e secundário Goat anti rabbit Alexa Fluor 488 (verde) e os núcleos celulares marcados com Hoechst (azul); N=15-20 imagens por grupo. Imagens representativas de 3 experimentos independentes. (B) quantificação da fluorescência celular total corrigida e (C) área ocupada pela marcação da JAM-B. (D) para quantificação da proteína JAM-B (33kDA)/ β -actina. Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. NE = não estimulado, ENP = eritrócito não parasitado, EP-PbA= eritrócito parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA. Barra de escala: 50 μ m.

A JAM é fundamental para a integridade da permeabilidade vascular, *in vivo* e *in vitro*. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) modula a expressão da JAM no endotélio pulmonar promovendo a disfunção da barreira paracelular. Além disso, a JAM regula a actinmiosina promovendo o rearranjo dos filamentos de actina e indução da diminuição pela fosforilação da miosina de cadeia leve (ORLOVA et al., 2006).

Gillrie e colaboradores observaram em células endoteliais da microvasculatura da derme humana, estimuladas com histone H3 recombinante, o aumento dos espaços celulares em consequência da diminuição da expressão da ZO-1 e JAM (GILLRIE et al., 2012). Nossos resultados anteriores mostraram que eritrócitos parasitados (*P. falciparum* e *P. berghei*) induzem a formação de NETs (do inglês, *neutrophils extracellular traps*), e conseqüentemente, a liberação de conteúdo nuclear de neutrófilos no meio extracelular, incluindo histonas (SERCUNDES et al., 2016), o que poderia contribuir para a diminuição da JAM e ZO-1 *in vivo*.

A expressão da JAM regula a função de barreira de células endoteliais pulmonares, enquanto a JAM-B diminui a abertura das junções, a JAM-C aumenta a permeabilidade vascular, e o bloqueio de JAM-C, mesmo após estímulo com VEGF, não provocou a injúria da junção de oclusão (REGLERO-REAL et al., 2016).

4.11 EP-PbA induzem a diminuição da Claudina 5 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

A Claudina 5 (CLDN5) é uma proteína de membrana plasmática expressa em células endoteliais que associa-se com ZO-1 e filamentos de actina, fundamentais para o controle da permeabilidade vascular endotelial (FANNING et al., 1998).

Os nossos resultados demonstraram que após estímulo com EP-PbA as CEPP-DBA/2 apresentaram diminuição da marcação de CLDN em relação as células não estimuladas ou estimulados com ENP (Fig.30A). Foi realizada a quantificação da expressão (Fig.30B), por análise de imagem e, foi observado maior expressão da fluorescência no grupo NE em comparação com o grupo EP-PbA (NE vs EP-PbA $p<0,001$) e (Fig.30C) da área ocupada pela marcação (NE vs EP-PbA $p<0,001$). Além disso, foi observado menores níveis proteicos (Fig.30D) após estímulo EP-PbA, sugerindo que o parasita interfere na abertura das junções de oclusão (NE vs EP-PbA $p<0,001$).

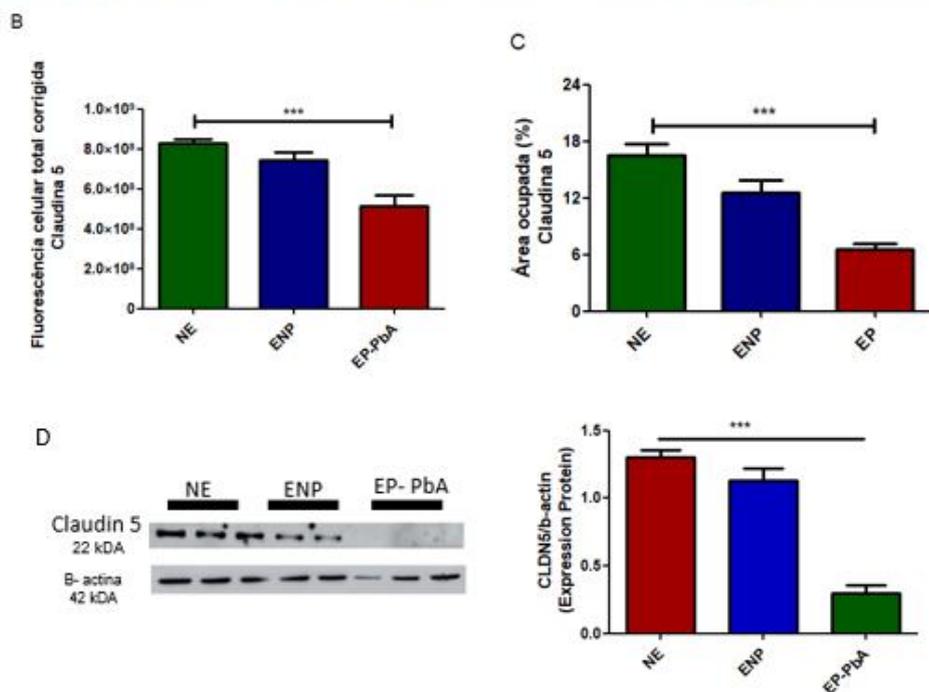
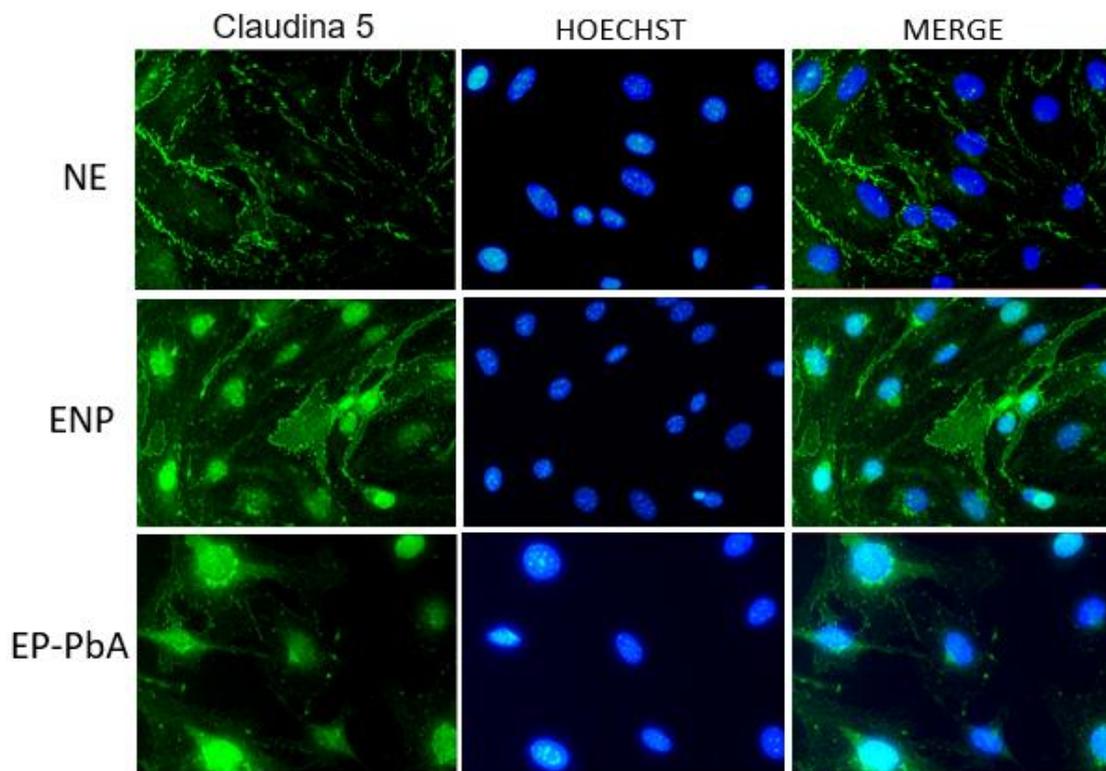


Figura 30 - EP-PbA induzem a diminuição da CLDN5 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 por imunofluorescência (A-C) e por Western blot (D). (A) Foram utilizados anticorpos anti-CLDN5 e secundário Goat anti rabbit Alexa Fluor 488 (verde) e os núcleos celulares marcados com Hoechst (azul); N=4 por grupo. Imagens representativas de 2 experimentos isolados. (B) quantificação da fluorescência celular total corrigida e (C) área ocupada pela marcação da CLDN5. (D) para quantificação da proteína CLDN5 (22kDa)/β-actina. Kruskal-Wallis. *** p<0,001. NE = não

estimulado, ENP = eritrócito não parasitado, EP-PbA= eritrócito parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA. Barra de escala: 50 µm.

A expressão de claudina 5 é reduzida nas células endoteliais após o estímulo com a quimiocina CCL2, promovendo a redução da resistência elétrica transepitelial e disrupção da barreira endotelial (STAMATOVIC et al., 2009).

O estímulo com estrato de eritrócitos parasitados com esquizontes de *Plasmodium falciparum* promoveu em células endoteliais a diminuição da expressão da CLDN5 e aumento da permeabilidade paracelular (GILLRIE et al., 2007)

A claudina 4 e 5 são as proteínas mais expressas em células endoteliais e epiteliais, entretanto enquanto a CLDN5 diminui durante o aumento da permeabilidade vascular, a CLDN4 é altamente expressa durante a SDRA, via ativação da proteína quinase C (PKC) aumentando os níveis do mRNA para CLDN4, o bloqueio da expressão das CLDN é mediada pela Jun-N-terminal kinase (JNK) (FRANK et al., 2012).

Durante a SDRA ocorre a diminuição da expressão de CLDN5 e esta é relacionado com a gravidade da injúria pulmonar. A utilização do simvastatin (inibidor da permeabilidade vascular) provocou o aumento dos níveis de CLDN5 e manutenção *in vitro* e *in vivo* da barreira endotelial e homeostase pulmonar (CHEN et al., 2014).

A CLDN5 é fundamental para manutenção da junção de oclusão, camundongos CLDN5-KO vão ao óbito após o nascimento com injúria pulmonar severa e aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica. A indução da expressão da CLDN5 em camundongos com SDRA diminui alterações da barreira paracelular e melhora a função pulmonar (JANG et al., 2011).

4.12 EP-PbA diminuem a expressão de VE-caderina em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

A VE-caderina é expressa em células epiteliais e endoteliais da microvasculatura de diferentes tecidos, presente na membrana plasmática, formando associações com a catenina p120 e α -catenina, ligando-se aos filamentos de actina, fundamentais para o controle da adesão célula-célula (DEJANA; ORSENIGO; LAMPUGNANI, 2008).

Os nossos resultados demonstraram que após estímulo com EP-PbA as CEPP-DBA/2 apresentaram diminuição da marcação da VE-caderina em relação as células não estimuladas ou estimulados com ENP (Fig.31A). Foi realizada a quantificação da expressão (Fig.31B), por análise de imagem e, foi observado maior expressão da fluorescência no grupo NE em comparação com o grupo EP-PbA (NE vs EP-PbA $p < 0,001$) e (Fig.31C) da área ocupada pela marcação (NE vs EP-PbA $p < 0,001$). Além disso, não foi observado alteração dos níveis proteicos (Fig.31D) após estímulo EP-PbA.

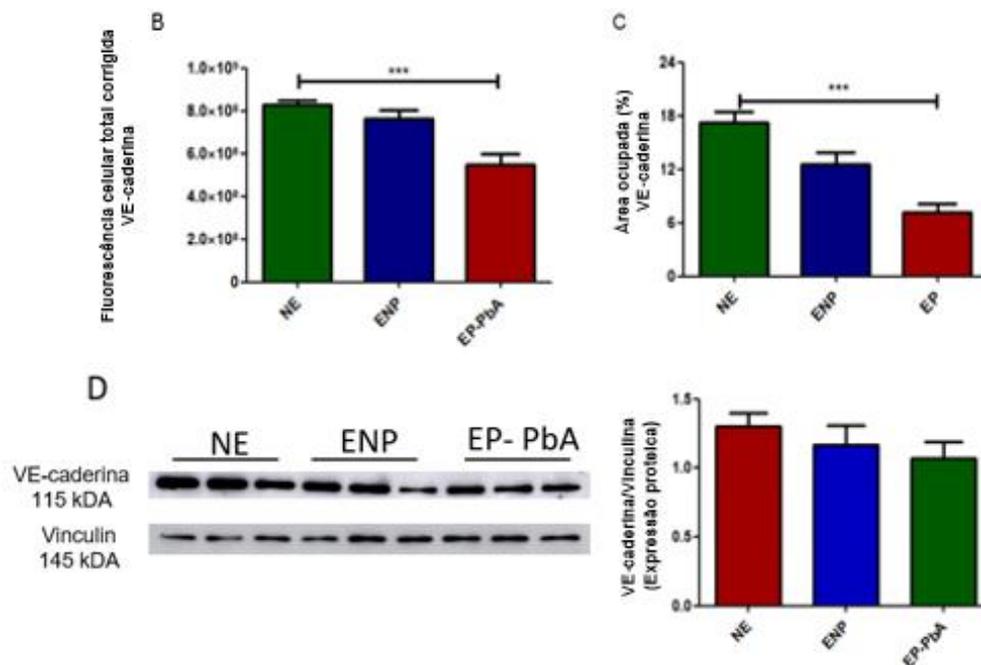
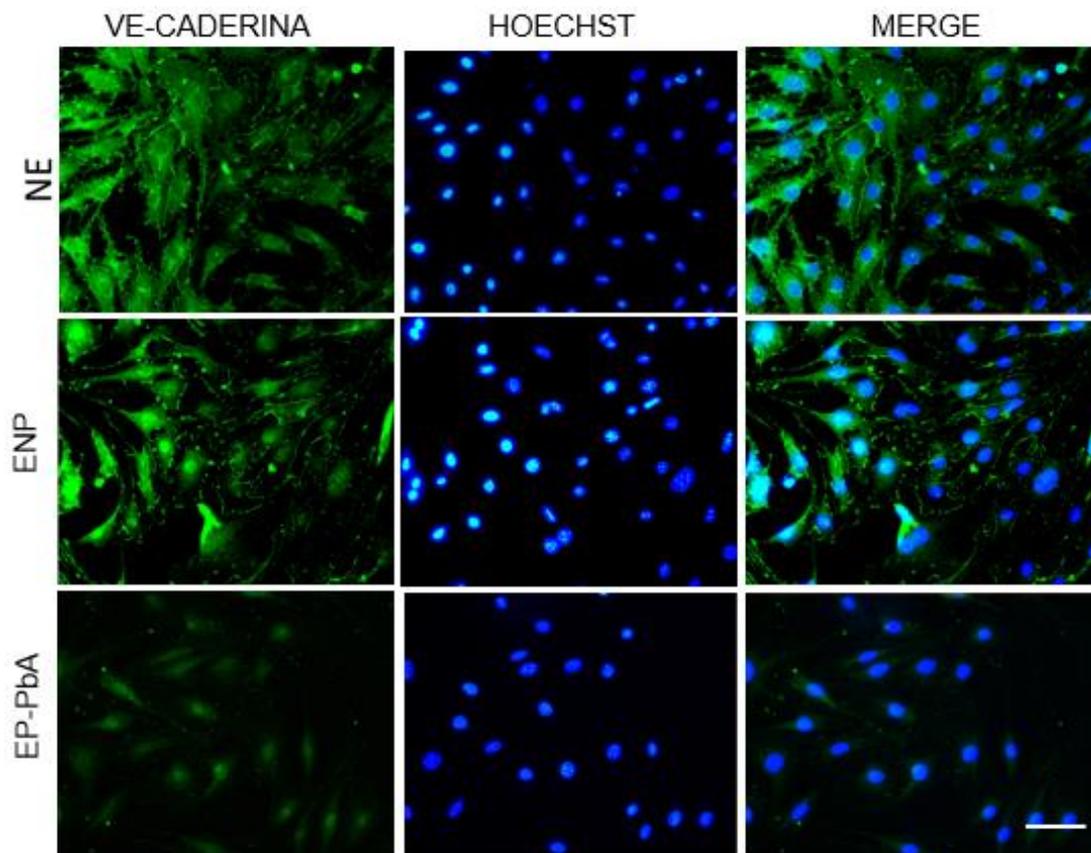


Figura 31 - EP-PbA diminuem a expressão de VE-caderina em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 por imunofluorescência (A-C). (A) Foram utilizados anticorpos anti-VE-caderina e secundário Goat anti rabbit Alexa Fluor 488 (verde) e os núcleos celulares marcados com Hoechst (azul); N=4 por grupo. Imagens representativas de 2 experimentos independentes. (B) quantificação da fluorescência celular total corrigida e (C) área ocupada pela marcação da Ve-caderina.

(D) para quantificação da proteína VE-caderina (115kDA)/Vinculina. Kruskal-Wallis. *** $p < 0,001$. NE = não estimulado, ENP = eritrócito não parasitado, EP-PbA= eritrócito parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA. Barra de escala: 50 μ m.

A VE-caderina é fundamental na junção de adesão sendo essencial no contato célula-célula, especialmente durante a SDRA, quando ocorre a redução desta proteína tanto *in vivo* quanto *in vitro* e o aumento da permeabilidade vascular (HERWIG et al., 2013). Células endoteliais expostas ao extrato de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. falciparum* não demonstram diferença na expressão de VE-caderina (GILLRIE et al., 2007). O mecanismo de disfunção da barreira alvéolo capilar é regulado pela ação da trombina, bradicina ou histamina sobre a via PKC nas células endoteliais induzindo a fosforilação da catenina p120 ligada a VE-caderina (AMAN et al., 2016), diminuindo a expressão da VE-caderina na superfície celular promovendo o aumento da abertura das junções (WALLEZ et al., 2007). A internalização da VE-caderina para o citoplasma celular é regulado pela via GTPases, induzindo a endocitose da proteína da superfície de membrana (CHICHGER et al., 2015).

4.13 EP-PbA provocam a diminuição da zônula de oclusão 1 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2

A zônula de oclusão (ZO-1) é expressa em células endoteliais, abundante no citoplasma, é uma proteína adaptadora formando associações com a junção de oclusão através do domínio PDZ e GUK e ligando-se aos filamentos de actina, fundamentais para o controle da permeabilidade vascular pulmonar

Os nossos resultados demonstraram que após estímulo com EP-PbA as CEPP-DBA/2 apresentaram diminuição da marcação de ZO-1 em relação as células não estimuladas ou estimulados com ENP (Fig.32A). Foi realizada a quantificação da expressão (Fig.32B), por análise de imagem e, foi observado maior expressão da fluorescência no grupo NE em comparação com o grupo EP-PbA (NE vs EP-PbA $p < 0,001$) e (Fig.32C) da área ocupada pela marcação (NE vs EP-PbA $p < 0,001$). Além disso, foi observado menores níveis proteicos (Fig.32D) após estímulo EP-PbA, sugerindo que o parasita interfere na abertura das junções de adesão (NE vs EP-PbA $p < 0,01$).

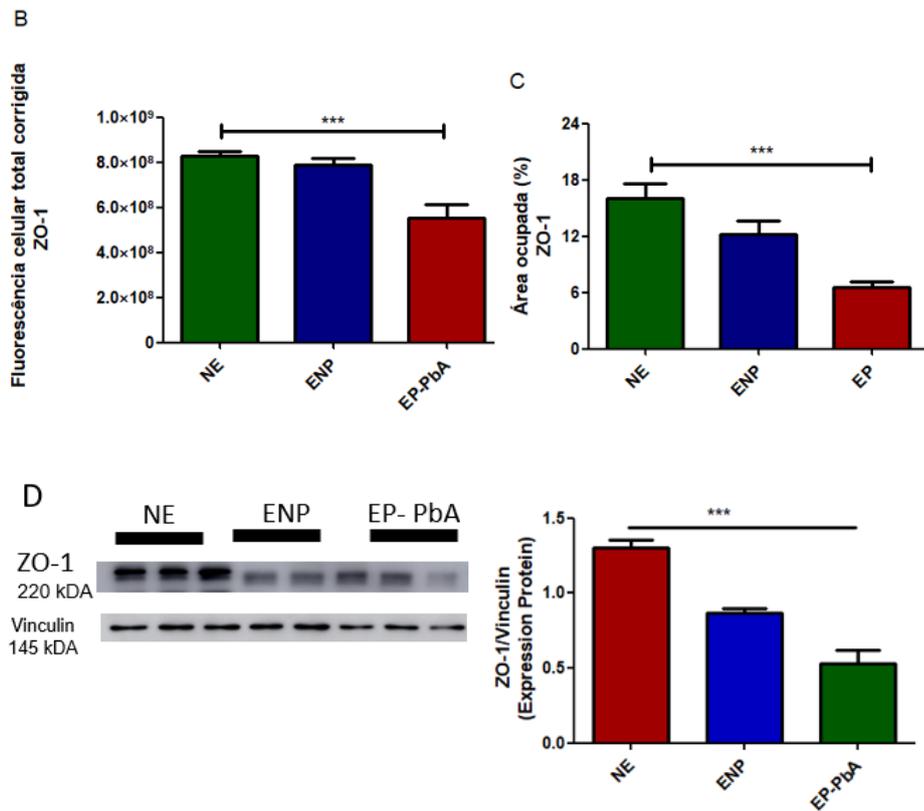
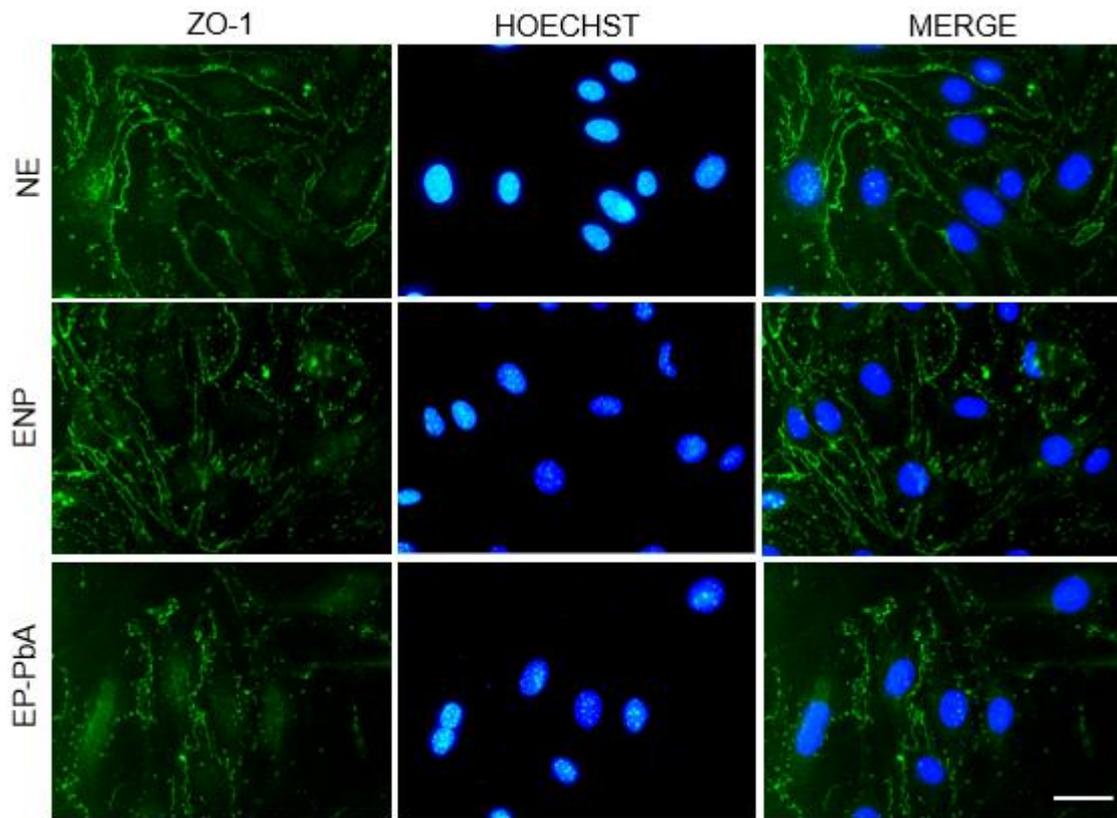


Figura 32 - EP-PbA provocam a diminuição da zônula de oclusão 1 em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 por imunofluorescência (A-C) e por Western blot (D).

(A) Foram utilizados anticorpos anti-ZO-1 e secundário Goat anti rabbit Alexa Fluor 488 (verde) e os núcleos celulares marcados com Hoechst (azul); N=4 por grupo. Imagens representativas de 2

experimentos isolados. (B) quantificação da fluorescência celular total corrigida e (C) área ocupada pela marcação da Ve-caderina. (D) para quantificação da proteína ZO-1 (220kDA)/Vinculina. Kruskal-Wallis. *** $p < 0,001$. NE = não estimulado, ENP = eritrócito não parasitado, EP-PbA= eritrócito parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA. Barra de escala: 50 μm .

A ZO-1 é uma proteína adaptadora que se associa a junção de oclusão ligando-se aos filamentos de actina estabilizando a função de barreira endotelial, a redução desta proteína promove a desregulação da actina-miosina e contração dos filamentos de actina (Sukrit et al., 2015). Ocorre a diminuição na expressão de ZO-1 em células endoteliais após estímulo com lisado de *P. falciparum* promovendo a diminuição da resistência transendotelial (GILLRIE et al., 2007). A depleção de ZO-1 no endotélio pulmonar promove o rearranjo das fibras de actina e aumento da permeabilidade vascular, camundongos ZO-1KO vão ao óbito ainda na fase embrionária devido a deficiência na formação dos vasos sanguíneos, demonstrando a atuação essencial na organização do tecido endotelial (TORNAVACA et al., 2015).

A citocina inflamatória TNF- α promove a diminuição da expressão da ZO-1 em células endoteliais pela fosforilação da miosina de cadeia leve aumentando a permeabilidade das junções de oclusão, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A inibição farmacológica da fosforilação da miosina de cadeia leve mesmo após estímulo com TNF- α reverte o aumento da permeabilidade vascular e regula a abertura das junções interendoteliais (SHEN et al., 2012).

5 CONCLUSÕES

- Camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA que desenvolvem SDRA apresentam: alta parasitemia no 7ºdpi, diminuição da frequência respiratória, aumento da pausa respiratória, diminuição do volume tidal e volume de ventilação, prolongamento do tempo de expiração e vão ao óbito entre o 7º e 12º dpi;
- A avaliação morfológica do modelo experimental pela tomografia computadorizada permite diferenciar os animais que desenvolvem ou não a síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária no 7º dia pós infecção;
- A quantificação da aeração pulmonar demonstrou que durante a síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária ocorre diminuição dos tecidos hiperinflados, normalmente aerados e pobremente aerados.
- Pela análise da aeração pulmonar foi observado acúmulo de líquidos como água (edema) e/ou sangue nos animais que desenvolvem SDRA, evidenciado pelo aumento dos tecidos não aerados no 5º e 7º dia após a infecção;
- Após 14º dias de infecção, os camundongos HP apresentam melhora da função pulmonar e acúmulo de tecidos pobremente aerados e redução dos tecidos não aerados;
- Os cortes topográficos analisados mostraram que há uma diminuição da perfusão pulmonar dos camundongos com a SDRA;
- É necessário o contato direto dos EP-PbA para promover o desarranjo nos filamentos de actina e o aumento das aberturas das junções interendoteliais nas CEPP-DBA/2;
- O contato com EP-PbA promove o aumento da permeabilidade vascular nas CEPP-DBA/2;
- EP-PbA induzem alterações nas junções oclusivas, aderentes e comunicantes nas CEPP-DBA/2, pois reduzem a expressão de proteínas como ocludina, claudina, JAM-B, ZO-1, VE-caderina e conexina 43.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTMAN, A. H.; KHAN, M.; MACLENNAN, I. C. M.; LANGHORNE, J. Plasmodium chabaudi chabaudi Infection in Mice Induces Strong B Cell Responses and Striking But Temporary Changes in Splenic Cell Distribution. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 1, p. 317–324, 2003. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.171.1.317>>.

AEFFNER, F.; BOLON, B.; DAVIS, I. C. Mouse models of acute respiratory distress syndrome. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 8, p. 1074–1092, 2015.

AGUIRRE-BERMEJO, H.; MORÁN, I.; BOTTIROLI, M.; ITALIANO, S.; PARRILLA, F. J.; PLAZOLLES, E.; ROCHE-CAMPO, F.; MANCEBO, J. End-inspiratory pause prolongation in acute respiratory distress syndrome patients: effects on gas exchange and mechanics. **Annals of Intensive Care**, v. 6, n. 1, 2016.

AITKEN, E. H.; NEGRI, E. M.; BARBOZA, R.; LIMA, M. R.; ÁLVAREZ, J. M.; MARINHO, C. R.; CALDINI, E. G.; EPIPHANIO, S. Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014.

AKBAR, M. U.; AHMAD, M. R.; SHAHEEN, A.; MUSHTAQ, S. A review on evaluation of technetium-99m labeled radiopharmaceuticals. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 310, n. 2, p. 477–493, 2016.

ALENCAR FILHO, A. C. de; LACERDA, M. V. G. de; OKOSHI, K.; OKOSHI, M. P. Malaria and Vascular Endothelium. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 165–169, 2014. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/abc.20140088>>.

ALESSANDRI, F.; PUGLIESE, F.; RANIERI, V. M. The Role of Rescue Therapies in the Treatment of Severe ARDS. **Respiratory Care**, v. 63, n. 1, p. 92–101, 2018. Disponível em: <<http://rc.rcjournal.com/lookup/doi/10.4187/respcare.05752>>.

AMATO, M.; ISOLA, A.; VIEIRA, S.; ROTMAN, V.; MOOCK, M.; JOSE, A.; FRANCA, S. III Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. S2, p. 128–136, 2007.

AMIN, Z.; AMANDA, A. P. Comparison of New ARDS Criteria (Berlin) with Old Criteria (AECC) and its Application in Country with Limited Facilities. v. 2, n. 1, p. 2–4, 2017.

ANDREEVA, A. Y.; KRAUSE, E.; MÜLLER, E. C.; BLASIG, I. E.; UTEPBERGENOV, D. I. Protein Kinase C Regulates the Phosphorylation and Cellular Localization of Occludin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38480–38486, 2001.

ANSTEY, N. M.; JACUPS, S. P.; CAIN, T.; PEARSON, T.; ZIESING, P. J.; FISHER, D. a; CURRIE, B. J.; MARKS, P. J.; MAGUIRE, G. P. 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. 1326–34, 2002.

ARAÚJO, E. B. De. CADERNOS TEMÁTICOS DE QUÍMICA NOVA NA ESCOLA Nº 6 – JULHO 2005 O técnico no diagnóstico de patologias. 2005.

ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. **The Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1608–1621, 2018.

ATUL MALHOTRA, M. . Low-Tidal-Volume Ventilation in the Acute Respiratory Distress Syndrome. v. 11, n. 9, p. 1113–1120, 2007.

AVELEIRA, A.; LIN, C.; ABCOUWER, S. F.; AMBRO, F.; ANTONETTI, D. A. TNF- α Signals Through PKC β /NF- κ B to Alter the Tight Junction Complex and Increase Retinal Endothelial Cell Permeability. **Diabetes**, v. 59, n. November, p. 2872–2882, 2010.

AVILA, P. E.; KIRCHGATTER, K.; BRUNIALTI, K. C. S.; OLIVEIRA, A. M.; SICILIANO, R. F.; DI SANTI, S. M. Evaluation of a rapid dipstick test, Malar-Check™, for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 5, p. 293–296, 2002.

BAJC, M.; JONSON, B. Ventilation/Perfusion SPECT for Diagnosis of Pulmonary Embolism and Other Diseases. **International Journal of Molecular Imaging**, v. 2011, n. 5, p. 1–7, 2011.

BALL, L.; VERCESI, V.; COSTANTINO, F.; CHANDRAPATHAM, K.; PELOSI, P. Lung imaging: how to get better look inside the lung. **Annals of Translational Medicine**, v. 5, n. 14,

p. 294–294, 2017.

BAMFORTH, S. D.; KNIESEL, U.; WOLBURG, H.; ENGELHARDT, B.; RISAU, W. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 1, p. 1879–1888, 1999.

BARBOSA, F. T.; CUNHA, R. M. da; BARBOSA, L. T. Von Willebrand's disease and anesthesia. **Revista brasileira de anesthesiologia**, v. 57, n. 3, p. 315–323, 2007.

BARBOSA, J. F.; BOLOGNESI, L. Radionuclídeos utilizados em pet/ct e suas aplicações. 2013.

BATES, J.; LAI-FOOK, S.; PARE, P.; PRIDE, N. Correspondence The Use and Misuse of Penh in Animal Models of Lung Disease. 2002.

BAZZONI, G.; DEJANA, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. **Physiol Rev.**, v. 84, n. 0031–9333 (Print), p. 869–901, 2004.

BELLANI, G.; MAURI, T.; PESENTI, A. Imaging in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Current Opinion in Critical Care**, v. 18, n. 1, p. 29–34, 2012.

BELLO, G.; BLANCO, P. Lung Ultrasonography for Assessing Lung Aeration in Acute Respiratory Distress Syndrome A Narrative Review. **Journal of Ultrasound in Medicine**, 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. de V. em S. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária - PNCM**. [s.l: s.n.]

BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; DE PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M.; JÚNIOR, C. B.; SILVA, S.; AREAS, A. L. L.; PELAJO-MACHADO, M.; DE ALVARENGA, D. A. M.; DA SILVA SANTELLI, A. C. F.; ALBUQUERQUE, H. G.; CRAVO, P.; SANTOS DE ABREU, F. V.; PETERKA, C. L.; ZANINI, G. M.; SUÁREZ MUTIS, M. C.; PISSINATTI, A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DE BRITO, C. F. A.; DE FÁTIMA FERREIRA-DA-CRUZ, M.; CULLETON, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: A molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, 2017.

BRASIL, ministerio da S. do. PNCM – Objetivos. 2017.

BUSCHMANN, M. M.; SHEN, L.; RAJAPAKSE, H.; RALEIGH, D. R.; WANG, Y.; WANG, Y.;

LINGARAJU, A.; ZHA, J.; ABBOTT, E.; MCAULEY, E. M.; BRESKIN, L. A.; WU, L.; ANDERSON, K.; TURNER, J. R.; WEBER, C. R. Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 19, p. 3056–3068, 2013.

CALDERARO, A.; PICCOLO, G.; GORRINI, C.; ROSSI, S.; MONTECCHINI, S.; DELL'ANNA, M. L.; DE CONTO, F.; MEDICI, M. C.; CHEZZI, C.; ARCANGELETTI, M. C. Accurate identification of the six human Plasmodium spp. causing imported malaria, including Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium knowlesi. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2013.

CÂNDIDO MOURA, G.; BARCELOS, D.; EPIPHANIO, S.; DOS, L.; ORTOLAN, S.; MOURA, G. C. Physiopathology of Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. v. 5, n. 4, 2017. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/physiopathology-of-malariaassociated-acute-respiratory-distresssyndrome-2329-8731-1000171.pdf>>.

CEREDA, M.; XIN, Y.; HAMEDANI, H.; BELLANI, G.; KADLECEK, S.; CLAPP, J.; GUERRA, L.; MEEDER, N.; RAJAEI, J.; TUSTISON, N. J.; GEE, J. C.; KAVANAGH, B. P.; RIZI, R. R. Tidal changes on CT and progression of ARDS. **Thorax**, v. 72, n. 11, p. 981–989, 2017.

CHEN, I. C.; KUO, J.; KO, W. J.; SHIH, H. C.; KUO, C. D. Increased flow resistance and decreased flow rate in patients with acute respiratory distress syndrome: The role of autonomic nervous modulation. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 79, n. 1, p. 17–24, 2016.

CHEN, L. Manufactured Aluminum Oxide Nanoparticles Decrease Expression of Tight Junction Proteins in Brain Vasculature. **Journal Neuroimmune Pharmacol**, v. 3, n. 4, p. 286–295, 2008.

CHEN, S.-F.; FEI, X.; SHAO-HUALI. **A New Simple Method for Isolation of Microvascular Endothelial Cells Avoiding Both Chemical and Mechanical Injuries**, 1995.

CHEN, W.; SHARMA, R.; RIZZO, A. N.; SIEGLER, J. H.; GARCIA, J. G. N.; JACOBSON, J. R. Role of claudin-5 in the attenuation of murine acute lung injury by simvastatin. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 50, n. 2, p. 328–336, 2014.

CHIBA, H.; OSANAI, M.; MURATA, M.; KOJIMA, T.; SAWADA, N. Transmembrane proteins

of tight junctions. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 3, p. 588–600, 2008.

CHIUMELLO, D.; FROIO, S.; BOUHEMAD, B.; CAMPOROTA, L.; COPPOLA, S. Clinical review: Lung imaging in acute respiratory distress syndrome patients--an update. **Critical care (London, England)**, v. 17, n. 6, p. 243, 2013.

CHIUMELLO, D.; MONGODI, S.; ALGIERI, I.; VERGANI, G. L.; ORLANDO, A.; VIA, G.; CRIMELLA, F.; CRESSONI, M.; MOJOLI, F. Assessment of Lung Aeration and Recruitment by CT Scan and Ultrasound in Acute Respiratory Distress Syndrome Patients. **Critical Care Medicine**, p. 1, 2018.

CHRISTMANN WAWRZENIAK, I.; REGINA, S.; VIEIRA, R.; ALMEIDA VICTORINO, J. Weaning from Mechanical Ventilation in ARDS: Aspects to Think about for Better Understanding, Evaluation, and Management. v. 2018, 2018.

CIÊNCIAS, F. De; RICARDO, B.; PEREIRA, P. Universidade nova de lisboa. **Design**, v. I, n. Vol I, p. 203, 2008.

COMHAIR, S. A. A.; XU, W.; MAVRAKIS, L.; ALDRED, M. A.; ASOSINGH, K.; ERZURUM, S. C. Human primary lung endothelial cells in culture. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 46, n. 6, p. 723–730, 2012.

CONWAY, J. Lung imaging - Two dimensional gamma scintigraphy, SPECT, CT and PET. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 4, p. 357–368, 2012.

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, 2016.

COX-SINGH, J.; HIU, J.; LUCAS, S. B.; DIVIS, P. C.; ZULKARNAEN, M.; CHANDRAN, P.; WONG, K. T.; ADEM, P.; ZAKI, S. R.; SINGH, B.; KRISHNA, S. Severe malaria - a case of fatal Plasmodium knowlesi infection with post-mortem findings: a case report. **Malaria journal**, v. 9, n. 1, p. 10, 2010.

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

CRESSONI, M.; CAIRONI, P.; POLLI, F.; CARLESSO, E.; CHIUMELLO, D.; CADRINGHER, P.; QUINTEL, M.; RANIERI, V. M.; BUGEDO, G.; GATTINONI, L. Anatomical and functional intrapulmonary shunt in acute respiratory distress syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 3, p. 669–675, 2008.

CRUZ, L. R.; SPANGENBERG, T.; LACERDA, M. V. G.; WELLS, T. N. C. Malaria in South America: A drug discovery perspective. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <Malaria Journal>.

D'ATRI, F.; CITI, S. Cingulin interacts with F-actin in vitro. **FEBS Letters**, v. 507, n. 1, p. 21–24, 2001.

DAKIN, O.; JONES, A. T.; HANSELL, D. M.; HOFFMAN, E. A.; EVANS, T. W. distribution in patients with ARDS. **Respirology**, v. 16, n. 8, p. 1265–1272, 2012.

DAVISON, C. A.; CHAPMAN, S. E.; SASSER, T. A.; WATHEN, C.; DIENER, J.; SCHAFER, Z. T.; LEEVY, W. M. Multimodal optical, X-ray CT, and SPECT imaging of a mouse model of breast cancer lung metastasis. **Current molecular medicine**, v. 13, n. 3, p. 368–376, 2013.

DE MATOS, G. F. J.; BARBAS, C. S. V. Importance of computed tomography scans of the chest in the evaluation of patients with acute respiratory distress syndrome. **Pulmão RJ**, v. 20, n. 3, p. 13–17, 2011.

DEJANA, E.; BAZZONI, G.; LAMPUGNANI, M. G. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? **Experimental cell research**, v. 252, n. 1, p. 13–19, 1999.

DEJANA, E.; ORSENIGO, F.; LAMPUGNANI, M. G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 13, p. 2115–2122, 2008.

DEJANA, E.; SPAGNUOLO, R.; BAZZONI, G. Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, n. 1, p. 308–315, 2001.

DEROOST, K.; PHAM, T. T.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. **The immunological balance between host and parasite in malaria**. [s.l.: s.n.]v. 40

DIMAIO, M. A.; PEREIRA, I. T.; GEORGE, T. I.; BANAEI, N. Performance of BinaxNOW for diagnosis of malaria in a U.S. Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2877–

2880, 2012.

DIMASTROMATTEO, J.; CHARLES, E. J.; LAUBACH, V. E. Molecular imaging of pulmonary diseases. **Respiratory Research**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2018.

DIXON, G. L. J.; HEYDERMAN, R. S.; VAN DER LEY, P.; KLEIN, N. J. High-level endothelial E-selectin (CD62E) cell adhesion molecule expression by a lipopolysaccharide-deficient strain of *Neisseria meningitidis* despite poor activation of NF- κ B transcription factor. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 135, n. 1, p. 85–93, 2004.

DOMBROWSKI, J. G.; SOUZA, R. M.; CURRY, J.; HINTON, L.; SILVA, N. R. M.; GRIGNARD, L.; GONÇALVES, L. A.; GOMES, A. R.; EPIPHANIO, S.; DRAKELEY, C.; HUGGETT, J.; CLARK, T. G.; CAMPINO, S.; MARINHO, C. R. F. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2017.

EBNET, K.; SCHULZ, C. U.; MEYER ZU BRICKWEDDE, M. K.; PENDL, G. G.; VESTWEBER, D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 36, p. 27979–27988, 2000.

ELZEIN, F.; MOHAMMED, N.; ALI, N.; BAHLOUL, A.; ALBADANI, A.; ALSHERBEENI, N. Pulmonary manifestation of *Plasmodium falciparum* malaria: Case reports and review of the literature. **Respiratory Medicine Case Reports**, v. 22, p. 83–86, 2017.

EPIPHANIO, S.; CAMPOS, M. G.; PAMPLONA, A.; CARAPAU, D.; PENA, A. C.; ATAÍDE, R.; MONTEIRO, C. a a; FÉLIX, N.; COSTA-SILVA, A.; MARINHO, C. R. F.; DIAS, S.; MOTA, M. M. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in Mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, p. 1–10, 2010.

ESHEL, Y.; ONSONGO, S.; MAINA, D.; LEVY-SCHREIER, S.; COHEN, L.; GLUCK, D.; POLLAK, J.; SALPETER, J. Evaluation of the Parasight Platform for Malaria Diagnosis. v. 55, n. 3, p. 768–775, 2017.

FALK, M. M.; KELLS, R. M.; BERTHOUD, V. M. Degradation of connexins and gap junctions. **FEBS Letters**, v. 588, n. 8, p. 1221–1229, 2014.

FALLIS, A. . Densitovolumetria Pulmonar Nas Doenças Intersticiais. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. Acute Respiratory Distress Syndrome. **Jama**, v. 319, n. 7, p. 698, 2018.

FANNING, A. S.; JAMESON, B. J.; JESAITIS, L. A.; ANDERSON, J. M. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29745–29753, 1998.

FELDMAN, G. J.; MULLIN, J. M.; RYAN, M. P. Occludin: Structure, function and regulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 6, p. 883–917, 2005.

FIORETTO, J. R.; DE CARVALHO, W. B. Temporal evolution of acute respiratory distress syndrome definitions. **Jornal De Pediatria**, v. 89, n. 6, p. 523–530, 2013.

FORATTINI, O. P. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. [s.l: s.n.].v. 11
FRANK, J. A.; FRANCISCO, S.; CALIFORNIA, N.; FRANCISCO, S. Claudins and alveolar epithelial barrier function in the lung. **Ann N Y Acad Sci**, n. 2, p. 175–183, 2012.

FRED, H. Drawbacks and Limitations of Computed Tomography Views from a Medical Educator. **Texas Heart Institute Journal**, v. 15, n. 4, p. 687–91, 2004.

FREEMAN, B. D.; MARTINS, Y. C.; AKIDE-NDUNGE, O. B.; BRUNO, F. P.; WANG, H.; TANOWITZ, H. B.; SPRAY, D. C.; DESRUISSEAU, M. S. Endothelin-1 Mediates Brain Microvascular Dysfunction Leading to Long-Term Cognitive Impairment in a Model of Experimental Cerebral Malaria. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 3, p. 1–21, 2016.

FREITAS, E. R. F. S. De. Ventilação mecânica em pacientes com síndrome da angústia respiratória aguda Mechanical ventilation in patients with acute respiratory distress syndrome. p. 53–60, 2007.

FRERICHS, I.; PULLETZ, S.; ELKE, G.; ZICK, G.; WEILER, N. Electrical Impedance Tomography in Acute Respiratory Distress Syndrome. **The Open Nuclear Medicine Journal**, v. 2, n. 1, p. 110–118, 2010.

FU, Y.; DING, Y.; ZHOU, T.-L.; OU, Q.; XU, W. Comparative Histopathology of Mice Infected With the 17XL and 17XNL Strains of Plasmodium yoelii. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 2, p. 310–315, 2012.

FUDALA, R.; KRUPA, A.; STANKOWSKA, D.; ALLEN, T. C.; KURDOWSKA, A. K. Does
100

activation of the FcγRIIIa play a role in the pathogenesis of the acute lung injury/acute respiratory distress syndrome? **Clinical Science**, v. 118, n. 8, p. 519–526, 2010.

FUNDA, D. E.; CELULAR, B. Mestrado em Biologia Celular e Molecular EFEITO DA LIPOXINA A 4 NA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO INDUZIDA DURANTE A MALÁRIA GRAVE EXPERIMENTAL Rio de Janeiro Junho de 2016 INSTITUTO OSWALDO CRUZ. 2016.

FURUSE, M.; HATA, M.; FURUSE, K.; YOSHIDA, Y.; HARATAKE, A.; SUGITANI, Y.; NODA, T.; KUBO, A.; TSUKITA, S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. **Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 6, p. 1099–1111, 2002.

FURUSE, M.; HIRASE, T.; ITOH, M.; NAGAFUCHI, A.; YONEMURA, S.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 6 II, p. 1777–1788, 1993a.

FURUSE, M.; HIRASE, T.; ITOH, M.; NAGAFUCHI, a.; YONEMURA, S.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 6 II, p. 1777–1788, 1993b.

FURUSE, M.; SASAKI, H.; FUJIMOTO, K.; TSUKITA, S. A Single Gene Product, Claudin-1 or -2, Reconstitutes Tight Junction Strands and Recruits Occludin in Fibroblasts. **Federation Proceedings**, v. 33, n. 3 (I), p. 391–401, 1998.

GALLEGO-DELGADO, J.; BASU-ROY, U.; TY, M.; ALIQUÉ, M.; FERNANDEZ-ARIAS, C.; MOVILA, A.; GOMES, P.; WEINSTOCK, A.; XU, W. Y.; EDAGHA, I.; WASSMER, S. C.; WALTHER, T.; RUIZ-ORTEGA, M.; RODRIGUEZ, A. Angiotensin receptors and beta-catenin regulate brain endothelial integrity in malaria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 10, p. 4016–4029, 2016.

GARCIA, M. Situação epidemiológica das arboviroses e malária Brasil, 2018. p. 7, 2018.

GATTINONI, L.; CAIRONI, P.; PELOSI, P.; GOODMAN, L. R. What has computed tomography taught us about the acute respiratory distress syndrome? **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, p. 1701–1711, 2001.

GATTINONI L, M. D.; PRESENTI, A. M.; TORRESIN, A. P.; BAGLIONI, S. M.; RIVOLTA, M. M.; ROSSI, F. M.; SCARANI, F. M.; MARCOLIN, R. M.; CAPPELLETTI, G. M. **Adult**

respiratory distress syndrome profiles by computed tom...: Journal of Thoracic Imaging*Journal of Thoracic Imaging*, 1986.

GIANNOTTA, M.; TRANI, M.; DEJANA, E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: Active guardians of vascular integrity. **Developmental Cell**, v. 26, n. 5, p. 441–454, 2013.

GILLRIE, M. R.; KRISHNEGOWDA, G.; LEE, K.; BURET, A. G.; ROBBINS, S. M.; LOOAREESUWAN, S.; GOWDA, D. C.; HO, M. Src-family kinase dependent disruption of endothelial barrier function by Plasmodium falciparum merozoite proteins. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3426–35, 2007.

GILLRIE, M. R.; LEE, K.; GOWDA, D. C.; DAVIS, S. P.; MONESTIER, M.; CUI, L.; HIEN, T. T.; DAY, N. P. J.; HO, M. Plasmodium falciparum histones induce endothelial proinflammatory response and barrier dysfunction. **American Journal of Pathology**, v. 180, n. 3, p. 1028–1039, 2012.

GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. de P.; MENDONÇA, E. G. de; OLIVEIRA, M. G. de A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por Plasmodium falciparum. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358–369, 2011.

GOODMAN, R. B.; PUGIN, J.; LEE, J. S.; MATTHAY, M. a. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 6, p. 523–535, 2003.

GUERRERO, T.; CASTILLO, R.; NOYOLA-MARTINEZ, J.; TORRES, M.; ZHOU, X.; GUERRA, R.; CODY, D.; KOMAKI, R.; TRAVIS, E. Reduction of pulmonary compliance found with high-resolution computed tomography in irradiated mice. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 67, n. 3, p. 879–887, 2007.

GUIDELINES. Síndrome De Distres Respiratorio Agudo. **Medicina**, v. 66, n. 4, p. 174–177, 2018.

GUNZEL, D.; YU, A. S. L. **Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability**. [s.l.: s.n.].v. 93

HALLER, J.; HYDE, D.; DELIOLANIS, N.; DE KLEINE, R.; NIEDRE, M.; NTZIACHRISTOS, V. Visualization of pulmonary inflammation using noninvasive fluorescence molecular imaging. v. 104, n. 3, p. 795–802, 2008.

HAYDOURA, S.; MAZBOUDI, O.; CHARAFEDDINE, K.; BOUAKL, I.; BABAN, T. a.; TAHER, A. T.; KANJ, S. S. Transfusion-related Plasmodium ovale malaria complicated by acute respiratory distress syndrome (ARDS) in a non-endemic country. **Parasitology International**, v. 60, n. 1, p. 114–116, 2011.

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

HEMINGWAY, J.; SHRETTA, R.; WELLS, T. N. C.; BELL, D.; DJIMDÉ, A. A.; ACHEE, N.; QI, G. Tools and Strategies for Malaria Control and Elimination: What Do We Need to Achieve a Grand Convergence in Malaria? **PLoS Biology**, v. 14, n. 3, p. 1–14, 2016.

HOCHHEGGER, B.; MARCHIORI, E.; IRION, K. L.; OLIVEIRA, H.; RESUMO, A.; HOCHHEGGER RUA JOÃO ALFREDO, B. Accuracy of measurement of pulmonary emphysema with computed tomography: relevant points* Acurácia da mensuração do enfisema pulmonar na tomografia computadorizada: pontos importantes. **Jul/Ago**, v. 43, n. 4, p. 260–265, 2010.

HOUNSFIELD G.N. Computerized transverse axial scanning(tomography):Part I description of system. **British Journal of Radiology**, v. 46, n. 552, p. 1016–1022, 1973.

HOWELL, M. D.; DAVIS, A. M. Management of ARDS in adults. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 319, n. 7, p. 711–712, 2018.

INAMURA, A.; ADACHI, Y.; INOUE, T.; HE, Y.; TOKUDA, N.; NAWATA, T.; SHIRAO, S.; NOMURA, S.; FUJII, M.; IKEDA, E.; OWADA, Y.; SUZUKI, M. Cooling treatment transiently increases the permeability of brain capillary endothelial cells through translocation of claudin-5. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 8, p. 1641–1647, 2013.

IONESCU, M.; METCALFE, R. W.; CODY, D.; ALVARADO, M. V. y.; HIPPI, J.; BENNDORF, G. Spatial Resolution Limits of Multislice Computed Tomography (MS-CT), C-arm-CT, and Flat Panel-CT (FP-CT) Compared to MicroCT for Visualization of a Small Metallic Stent. **Academic Radiology**, v. 18, n. 7, p. 866–875, 2011.

IRION, K. L.; HOCHHEGGER, B.; MARCHIORI, E.; PORTO, N. D. S.; BALDISSEROTTO, S. D. V.; SANTANA, P. R. Chest X-ray and computed tomography in the evaluation of pulmonary emphysema | Radiograma de tórax e tomografia computadorizada na avaliação do enfisema

pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 6, p. 720–732, 2007.

ISABEL, C.; JUNG, G.; LONGO, E.; OAIGEN, F. P.; RÉGIS, G.; FRANCISCO, L. Influência do posicionamento terapêutico na ventilação, perfusão, complacência e oxigenação pulmonar. **Rev Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 8, n. 26, p. 43–51, 2010.

ISITMAN, a T.; COLLIER, B. D.; PALMER, D. W.; TREMBATH, L.; KRASNOW, a Z.; RAO, S. a; HELLMAN, R. S.; HOFFMANN, R. G.; PECK, D. C.; DELLIS, C. J. Comparison of technetium-99m pyrophosphate and technetium-99m DTPA aerosols for SPECT ventilation lung imaging. **Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 29, n. 11, p. 1761–1767, 1988.

ITALLIE, C. Van; RAHNER, C.; ANDERSON, J. M. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. **Growth**, v. 107, n. 3.4, p. 1–6, 2001.

ITOH, M.; FURUSE, M.; MORITA, K.; KUBOTA, K.; SAITOU, M.; SHOICHIRO, T. and ZO-3, with the COOH Termini of Claudins. **The Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 6, p. 1351–1363, 1999.

JACENE, H. A.; COHADE, C.; WAHL, R. L. F-18 FDG PET/CT in acute respiratory distress syndrome: a case report. **Clin Nucl Med**, v. 29, n. 12, p. 786–788, 2004.

JACKSON, C. J.; GARBETT, P. K.; NISSEN, B.; SCHRIEBER, L. Binding of human endothelium to *Ulex europaeus* I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. **Journal of cell science**, v. 96 (Pt 2), p. 257–62, 1990.

JANG, A. S.; CONCEL, V. J.; BEIN, K.; BRANT, K. A.; LIU, S.; POPE-VARSALONA, H.; DOPICO, R. A.; DI, Y. P. P.; KNOELL, D. L.; BARCHOWSKY, A.; LEIKAUF, G. D. Endothelial dysfunction and Claudin 5 regulation during acrolein-induced lung injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 44, n. 4, p. 483–490, 2011.

JOBSE, B. N.; RHEM, R. G.; WANG, I. Q.; COUNTER, W. B.; STAMPFLI, M. R.; LABIRIS, N. R. Detection of Lung Dysfunction Using Ventilation and Perfusion SPECT in a Mouse Model of Chronic Cigarette Smoke Exposure. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 54, n. 4, p. 616–623, 2013.

JOGI, J.; JONSON, B.; EKBERG, M.; BAJC, M. Ventilation-Perfusion SPECT with 99mTc-

DTPA Versus Technegas: A Head-to-Head Study in Obstructive and Nonobstructive Disease. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 5, p. 735–741, 2010.

JR, A. S.; NETO, C. A. Terminologia para a descrição de tomografia computadorizada do tórax: sugestões iniciais para um consenso brasileiro. **Radiologia Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 125–128, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-39842002000200016&script=sci_arttext>.

K., T.; TURKSEN, K.; TROY, T.-C. Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. **Development**, v. 129, n. 7, p. 1775–1784, 2002.

KARMRODT, J.; BLETZ, C.; YUAN, S.; DAVID, M.; HEUSSEL, C. P.; MARKSTALLER, K. Quantification of atelectatic lung volumes in two different porcine models of ARDS. **British Journal of Anaesthesia**, v. 97, n. 6, p. 883–895, 2006.

KASHEFI, A.; KUO, J.; SHELTON, D. K. Molecular imaging in pulmonary diseases. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 197, n. August, p. 295–307, 2011.

KATRAK, S.; NAYEBARE, P.; REK, J.; ARINAITWE, E.; NANKABIRWA, J. I.; KAMYA, M.; DORSEY, G.; ROSENTHAL, P. J.; GREENHOUSE, B. Clinical consequences of submicroscopic malaria parasitaemia in Uganda. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2018.

KHALIL, M. M.; TREMOLEDA, J. L.; BAYOMY, T. B.; GSELL, W. Molecular SPECT Imaging: An Overview. **International Journal of Molecular Imaging**, v. 2011, p. 1–15, 2011.

KIRCHGATTER, K.; DEL PORTILLO, H. A. Clinical and molecular aspects of severe malaria. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 77, n. 3, p. 455–475, 2005.

KLAPSING, P.; HERRMANN, P.; QUINTEL, M.; MOERER, O. Automatic quantitative computed tomography segmentation and analysis of aerated lung volumes in acute respiratory distress syndrome—A comparative diagnostic study. **Journal of Critical Care**, v. 42, p. 184–191, 2017.

KNISS, T.; LAUBE, M.; WUEST, F.; PIETZSCH, J. Technetium-99m based Small Molecule Radiopharmaceuticals and Radiotracers Targeting Inflammation and Infection. **Dalton Trans.**, 2017.

KOBAYASHI, N.; LEI, J.; UTECHT, L.; GARWOOD, M.; INGBAR, D.; BHARGAVA, M. 3D Cine Magnetic Resonance Imaging of Rat Lung ARDS using Gradient-modulated SWIFT with

Retrospective Respiratory Gating. **Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering**, v. 9417, p. 1–12, 2015.

KOHLSTEDT, K.; BRANDES, R. P.; MÜLLER-ESTERL, W.; BUSSE, R.; FLEMING, I. Angiotensin-Converting Enzyme Is Involved in Outside-in Signaling in Endothelial Cells. **Circulation Research**, v. 94, n. 1, p. 60–67, 2004.

KOMAROVA, Y. A.; KRUSE, K.; MEHTA, D.; MALIK, A. B. Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. **Circulation Research**, v. 120, n. 1, p. 179–206, 2017.

KONRAD, F. M.; KNAUSBERG, U.; HONE, R.; NGAMSRI, K. C.; REUTERSHAN, J. Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation. **Mucosal Immunol**, v. 9, n. 1, p. 98–111, 2016.

KRAUSE, G.; WINKLER, L.; MUELLER, S. L.; HASELOFF, R. F.; PIONTEK, J.; BLASIG, I. E. Structure and function of claudins. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 3, p. 631–645, 2008.

LALREMRUATA, A.; JEYARAJ, S.; ENGLEITNER, T.; JOANNY, F.; LANG, A.; BÉLARD, S.; MOMBO-NGOMA, G.; RAMHARTER, M.; KREMSNER, P. G.; MORDMÜLLER, B.; HELD, J. Species and genotype diversity of Plasmodium in malaria patients from Gabon analysed by next generation sequencing. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2017.

LAMPUGNANI, M. G.; DEJANA, E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 674–682, 1997.

LAVSTSEN, T.; TURNER, L.; SAGUTI, F.; MAGISTRADO, P.; RASK, T. S.; JESPERSEN, J. S.; WANG, C. W.; BERGER, S. S.; BARAKA, V.; MARQUARD, A. M.; SEGUIN-ORLANDO, A.; WILLERSLEV, E.; GILBERT, M. T. P.; LUSINGU, J.; THEANDER, T. G. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. E1791–E1800, 2012.

LEE, H.; ZHENG, J. J. Lee 2010 rv, PDZ Domain. **Cell Communication and Signaling**, p. 1–18, 2010.

LIMA, L. S. Radiação gama. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, p. 1–2, 2014.

LIU, M.; GU, C.; WANG, Y. Upregulation of the tight junction protein occludin: effects on ventilation-induced lung injury and mechanisms of action. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2014.

LUNDBLAD, L. K. A.; IRVIN, C. G.; HANTOS, Z.; SLY, P.; MITZNER, W.; BATES, J. H. T. Penh is not a measure of airway resistance! [1]. **European Respiratory Journal**, v. 30, n. 4, p. 805, 2007.

MA, H.; HUANG, D.; GUO, L.; CHEN, Q.; ZHONG, W.; GENG, Q.; ZHANG, M. Strong correlation between lung ultrasound and chest computerized tomography imaging for the detection of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome in rats. **Journal of Thoracic Disease**, v. 8, n. 7, p. 1443–1448, 2016.

MANABE, A.; FURUKAWA, C.; ENDO, S.; MARUNAKA, K.; NISHIYAMA, T.; FUJII, N.; TABUCHI, Y.; MATSUNAGA, T.; IKARI, A. Chlorpheniramine increases paracellular permeability to marker fluorescein lucifer yellow mediated by internalization of occludin in murine colonic epithelial cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 1299–1305, 2017.

MARCHIORI, E.; CHAVES, M.; IRION, K. L.; JASINOVODOLINSK, D.; DALTRO, P.; NOBRE, L. F.; FUNARI, M. Consenso Brasileiro sobre a Terminologia dos Descritores de Tomografia Computadorizada do Tórax. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 1, p. 149–156, 2005.

MARCHIORI, E.; ZANETTI, G.; HOCHHEGGER, B.; CANELLA, C.; IRION, K. Carta ao Editor. **J Bras Pneumol.**, p. 37–39, 2013.

MARKSTALLER, K.; EBERLE, B.; KAUCZOR, H. U.; SCHOLZ, A.; BINK, A.; THELEN, M.; HEINRICH, W.; WEILER, N. Temporal dynamics of lung aeration determined by dynamic CT in a porcine model of ARDS. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 3, p. 459–468, 2001.

MARKSTALLER, K.; KAUCZOR, H. U.; WEILER, N.; KARMRODT, J.; DOEBRICH, M.; FERRANTE, M.; THELEN, M.; EBERLE, B. Lung density distribution in dynamic CT correlates with oxygenation in ventilated pigs with lavage ARDS. **British Journal of Anaesthesia**, v. 91, n. 5, p. 699–708, 2003.

MATA-CANTERO, L.; LAFUENTE, M. J.; SANZ, L.; RODRIGUEZ, M. S. Magnetic isolation of Plasmodium falciparum schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and synchronized in

vitro culture. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2014.

MCCLOY, R. A.; ROGERS, S.; CALDON, C. E.; LORCA, T.; CASTRO, A.; BURGESS, A. Partial inhibition of Cdk1 in G2phase overrides the SAC and decouples mitotic events. **Cell Cycle**, v. 13, n. 9, p. 1400–1412, 2014.

MERCAT, a; DIEHL, J. L.; MICHARD, F.; ANGUEL, N.; TEBOUL, J. L.; LABROUSSE, J.; RICHARD, C. Extending inspiratory time in acute respiratory distress syndrome. **Critical care medicine**, v. 29, n. 1, p. 40–44, 2001.

MEŞE, G.; RICHARD, G.; WHITE, T. W. Gap junctions: Basic structure and function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 11, p. 2516–2524, 2007.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. Coqueluche. **Guia de Vigilância em Saúde**, p. 705, 2017.

MIOTO, L. D.; GALHARDI, L. C. F.; AMARANTE, M. K. Aspectos parasitológicos e imunológicos da malária. **Biosaúde**, v. 14, n. 1, p. 42–55, 2012.

MOCELIN, H.; BUENO, G.; IRION, K.; MARCHIORI, E.; SARRIA, E.; WATTE, G.; HOCHHEGGER, B. Original Article. v. 39, n. September, p. 1–7, 2016.

MOHAN, A.; SHARMA, S. K.; BOLLINENI, S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. **J Vector Borne Dis**, v. 45, n. September, p. 179–193, 2008.

MONTEIRO, M. R. de C. C.; RIBEIRO, M. C.; FERNANDES, S. C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da malária em um hospital universitário de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 2, p. 33–43, 2013.

MOREIRA BRAZ, R.; LUIZ TAUIL, P.; CAROLINA FARIA E SILVA SANTELLI, A.; JESUS FERNANDES FONTES, C. Avaliação da completude e da oportunidade das notificações de malária na Amazônia Brasileira, 2003-2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 1, p. 10–1, 2016.

NEGRIN, L. L.; PROSCH, H.; KETTNER, S.; HALAT, G.; HEINZ, T.; HAJDU, S. The clinical

benefit of a follow-up thoracic computed tomography scan regarding parenchymal lung injury and acute respiratory distress syndrome in polytraumatized patients. **Journal of Critical Care**, v. 37, p. 211–218, 2017.

NORIA, S.; COWAN, D. B.; GOTLIEB, A. I.; LANGILLE, B. L. Endothelial Cell Adherens Junctions. p. 504–515, 2016.

OBADINA, E. T.; TORREALBA, J. M.; KANNE, J. P. Acute pulmonary injury: High-resolution CT and histopathological spectrum. **British Journal of Radiology**, v. 86, n. 1027, p. 3–7, 2013.

OCHIAI, R. Mechanical ventilation of acute respiratory distress syndrome. **Journal of Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2015.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 151–165, 2006.

OLIVIER, M.; SHIO, M. T.; KASSA, F. A.; BELLEMARE, M. J. Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 12–13, p. 889–899, 2010.

ORLOVA, V. V.; ECONOMOPOULOU, M.; LUPU, F.; SANTOSO, S.; CHAVAKIS, T. Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 12, p. 2703–2714, 2006.

ORTOLAN, L. S. Citoadesão na imunopatogênese da síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária. **Teses USP**, p. 22, 2017.

ORTOLAN, L. S.; SERCUNDES, M. K.; BARBOZA, R.; DEBONE, D.; MURILLO, O.; HAGEN, S. C. F.; RUSSO, M.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M.; AMAKU, M.; MARINHO, C. R. F.; EPIPHANIO, S. Predictive Criteria to Study the Pathogenesis of Malaria-Associated ALI/ARDS in Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

OVAS; COIMBRA, R.; OIMBRA, O.; SILVERIO, C. C.; ILVERIO, I. I I I I Introdução Ntrodução Ntrodução. **Rev Ass Med Brasil**, v. 47, n. 4, p. 358–64, 2001.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, 109

n. 3, p. 469–473, 2015.

PASTERNAK, N. D.; DZIKOWSKI, R. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 7, p. 1463–1466, 2009.

PATRONITI, N.; PESENTI, A. Low tidal volume, high respiratory rate and auto-PEEP: The importance of the basics. **Critical Care**, v. 7, n. 2, p. 105–106, 2003.

PAULA, A. B. de; BARROS, L. S.; COTA, M. de A. L.; MAGALHÃES, T. D.; TEIXEIRA, G. H. S.; MARÇAL, E. da C. A r t i g o s. **Revista Ciência e Saúde**, n. 31, p. 4–24, 2016.

PELOSI, P.; DE ABREU, M. G. Acute respiratory distress syndrome: We can't miss regional lung perfusion! **BMC Anesthesiology**, v. 15, n. 1, p. 14–16, 2015.

PEREIRA, M. L. M.; ORTOLAN, L. S.; SERCUNDES, M. K.; DEBONE, D.; MURILLO, O.; LIMA, F. A.; MARINHO, C. R. F.; EPIPHANIO, S. Association of Heme Oxygenase 1 with Lung Protection in Malaria-Associated ALI/ARDS. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

PESENTI, A.; MUSCH, G.; LICHTENSTEIN, D.; MOJOLI, F.; AMATO, M. B. P.; CINNELLA, G.; GATTINONI, L.; QUINTEL, M. Imaging in acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Medicine**, v. 42, n. 5, p. 686–698, 2016.

PESENTI, A.; TAGLIABUE, P.; PATRONITI, N.; FUMAGALLI, R. Computerised tomography scan imaging in acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Medicine**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 2001.

POLLAK, J. J.; HOURI-YAFIN, A.; SALPETER, S. J. Computer Vision Malaria Diagnostic Systems—Progress and Prospects. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. August, p. 1–5, 2017.

PORTUGAL, S.; DRAKESMITH, H.; MOTA, M. M. Superinfection in malaria: *Plasmodium* shows its iron will. **EMBO Reports**, v. 12, n. 12, p. 1233–1242, 2011.

PRESIDENT, J. L. P.; VICE-PRESIDENT, J. K. Diretrizes da SBPT Brazilian Consensus on Terminology Used to Describe. v. 32, n. 1, p. 149–156, 2005.

PRESTEL, C.; TAN, K. R.; ABANYIE, F.; JERRIS, R.; GUTMAN, J. R. Malaria diagnostic practices in U.S. Laboratories in 2017. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1–9,

2018.

PUYBASSET, L.; CLUZEL, P.; GUSMAN, P.; GRENIER, P.; PRETEUX, F.; ROUBY, J. J. Regional distribution of gas and tissue in acute respiratory distress syndrome. I. Consequences for lung morphology. **Intensive Care Medicine**, v. 26, n. 7, p. 857–869, 2000.

QIAO, H.; LI, J.; CHEN, Y.; WANG, D.; HAN, J.; MEI, M.; LI, D. A study of the metabolism of transplanted tumor in the lung by micro PET/CT in mice. **Medical Engineering and Physics**, v. 36, n. 3, p. 294–299, 2014.

RANIERI, V. M.; RUBENFELD, G. D.; THOMPSON, B. T.; FERGUSON, N. D.; CALDWELL, E.; FAN, E.; CAMPOROTA, L.; SLUTSKY, A. S. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 23, p. 2526–2533, 2012.

RAO, R. K.; BASUROY, S.; RAO, V. U.; KARNAKY, K. J.; GUPTA, A. E-cadherin – β -catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. **Society**, v. 481, p. 471–481, 2002.

RECHT, J.; SIQUEIRA, A. M.; MONTEIRO, W. M.; HERRERA, S. M.; HERRERA, S.; LACERDA, M. V. G. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2017.

REGLERO-REAL, N.; COLOM, B.; BODKIN, J. V.; NOURSHARGH, S. Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 36, n. 10, p. 2048–2057, 2016.

RESKE, A. W.; RAU, A.; RESKE, A. P.; KOZIOL, M.; GOTTWALD, B.; ALEF, M.; IONITA, J. C.; SPIETH, P. M.; HEPP, P.; SEIWERTS, M.; BEDA, A.; BORN, S.; SCHEUERMANN, G.; AMATO, M. B. P.; WRIGGE, H. Extrapolation in the analysis of lung aeration by computed tomography: A validation study. **Critical Care**, v. 15, n. 6, p. R279, 2011.

RIVIELLO, E.; BUREGEYA, E.; TWAGIRUMUGABE, T. [rivielo_2017_diagnosing.pdf](#), [s.d.].
ROACH, P. J.; GRADINSCAK, D. J.; SCHEMBRI, G. P.; BAILEY, E. A.; WILLOWSON, K. P.; BAILEY, D. L. SPECT/CT in V/Q scanning. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 40, n. 6, p. 455–466, 2010.

ROCH, A.; GUERVILLY, C.; PAPAZIAN, L. Fluid management in acute lung injury and ards.

Annals of Intensive Care, v. 1, n. 1, p. 16, 2011.

RODRIGUES, C.; NETO, D. L. Controle da malária em um município amazônico 1. v. 19, n. 6, 2011.

RODRIGUES, G.; GUERRA, R.; ALVES, F. Avaliação cintilográfica de diferentes dosagens de Tecnécio-99m na padronização da perfusão pulmonar em cães da raça Rottweiler. **Ciência Rural**, p. 554–560, 2010.

ROSA, R. G.; RUTZEN, W.; MADEIRA, L.; ASCOLI, A. M.; DEXHEIMER NETO, F. L.; MACCARI, J. G.; OLIVEIRA, R. P. de; TEIXEIRA, C. Use of thoracic electrical impedance tomography as an auxiliary tool for alveolar recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome: case report and brief literature review. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 27, n. 4, p. 406–411, 2015.

ROTTA, A. T.; PIVA, J. P.; ANDREOLIO, C.; DE CARVALHO, W. B.; GARCIA, P. C. R. Progress and perspectives in pediatric acute respiratory distress syndrome. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 27, n. 3, p. 266–273, 2015.

ROUBY, J.-J.; PUYBASSET, L.; NIESZKOWSKA, A.; LU, Q. Acute respiratory distress syndrome: Lessons from computed tomography of the whole lung. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. Supplement, p. S285–S295, 2003. e&an=00003246-200304001-00018>.

RUTH, A.; ARCANJO, L.; VINÍCIUS, M.; LACERDA, G. De; DUARTE, W.; COSTA, G. diagnóstico da malária , na Atenção Básica de Saúde , no município de Manaus , Amazonas malaria within primary healthcare in the municipality of Manaus , Amazonas. v. 40, n. 1, p. 88–90, 2007.

SAHETYA, S. K.; GOLIGHER, E. C.; BROWER, R. G. Setting positive end-expiratory pressure in acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 195, n. 11, p. 1429–1438, 2017.

SALERI, N.; GULLETTA, M.; MATTEELLI, A.; CALIGARIS, S.; TOMASONI, L. R.; ANTONINI, B.; PERANDIN, F.; CASTELLI, F. Acute respiratory distress syndrome in Plasmodium vivax malaria in traveler returning from Venezuela. **Journal of Travel Medicine**, v. 13, n. 2, p. 112–113, 2006.

SASAKI, M.; CHUBACHI, S.; KAMEYAMA, N.; SATO, M.; HARAGUCHI, M.; MIYAZAKI, M.;

TAKAHASHI, S.; BETSUYAKU, T. Evaluation of cigarette smoke-induced emphysema in mice using quantitative micro-computed tomography. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 10, p. L1039–L1045, 2015.

SAÚDE, M. da. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária Manual de Diagnóstico**. [s.l.: s.n.]

SCHWOCHAU, K. Technetium Radiopharmaceuticals—Fundamentals, Synthesis, Structure, and Development. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 33, n. 22, p. 2258–2267, 1994.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. Vigilância em saúde. Boletim Epidemiológico - Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. v. 46, n. 25, n. 25, 2015.

SERCUNDES, M. K.; ORTOLAN, L. S.; DEBONE, D.; SOEIRO-PEREIRA, P. V.; GOMES, E.; AITKEN, E. H.; NETO, A. C.; RUSSO, M.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M.; PORTUGAL, S.; MARINHO, C. R. F.; EPIPHANIO, S. Targeting Neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 12, p. 1–24, 2016.

SHARMA, L.; SHUKLA, G. Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. **Frontiers in Medicine**, v. 4, n. July, p. 1–6, 2017.

SHEARD, S.; RAO, P.; DEVARAJ, A. Imaging of Acute Respiratory Distress Syndrome. **Respiratory Care**, v. 57, n. 4, p. 607–612, 2012.

SILVA, I.; MARCHIORI, E.; SOARES, A.; JÚNIOR, S.; MÜLLER, N. L. Consenso brasileiro ilustrado sobre a terminologia dos descritores e padrões fundamentais da TC de tórax* Illustrated Brazilian consensus of terms and fundamental patterns in chest CT scans. **J Bras Pneumol**, v. 36, n. 17, p. 99–123, 2010.

SIMÕES, L. rodrigues; ALVES-JR, E. R.; RIBATSKI-SILVA, D.; GOMES, L. T. Fatores associados às recidivas de malária causada por Plasmodium vivax no Município de Porto Velho , Rondônia, Brasil , 2009. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 30, n. 7, p. 1–15, 2014.

SIMON, B. A. Computed Tomography Studies of Lung Mechanics. **Proceedings of the**

American Thoracic Society, v. 2, n. 6, p. 517–521, 2005.

SIMON, M.; BRAUNE, S.; LAQMANI, A.; METSCHKE, M.; BERLINER, C.; KALSOW, M.; KLOSE, H.; KLUGE, S. Value of Computed Tomography of the Chest in Subjects With ARDS: A Retrospective Observational Study. **Respiratory Care**, v. 61, n. 3, p. 316–323, 2016.

SINGH, P. P. iMedPub Journals Pathogenesis and Experimental Models of Cerebral Malaria : A Review Abstract. p. 1–11, 2018.

SÖHL, G.; WILLECKE, K. Gap junctions and the connexin protein family. **Cardiovascular Research**, v. 62, n. 2, p. 228–232, 2004.

SOULARD, V.; ROLAND, J.; SELIER, C.; GRUNER, A. C.; LEITE-DE-MORAES, M.; FRANETICH, J. F.; RÉNIA, L.; CAZENAVE, P. A.; PIED, S. Primary infection of C57BL/6 mice with *Plasmodium yoelii* induces a heterogeneous response of NKT cells. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2511–2522, 2007.

SOUZA, M. C.; SILVA, J. D.; PÁDUA, T. A.; CAPELOZZI, V. L.; ROCCO, P. R. M.; HENRIQUES, M. das G. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 186, n. 1, p. 65–72, 2013.

STAMATOVIC, S. M.; KEEP, R. F.; WANG, M. M.; JANKOVIC, I.; ANDJELKOVIC, A. V. Caveolae-mediated internalization of occludin and claudin-5 during CCL2-induced tight junction remodeling in brain endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 28, p. 19053–19056, 2009.

SUKRITI, S.; TAUSEEF, M.; YAZBECK, P.; MEHTA, D. Mechanisms regulating endothelial permeability. **Pulmonary Vascular Research Institute**, v. 4, n. 4, p. 535–551, 2015.

SUMMERS, C.; SINGH, N. R.; WORPOLE, L.; SIMMONDS, R.; BABAR, J.; CONDLIFFE, A. M.; GUNNING, K. E.; JOHNSTON, A. J.; CHILVERS, E. R. Incidence and recognition of acute respiratory distress syndrome in a UK intensive care unit. **Thorax**, v. 71, n. 11, p. 1050–1051, 2016.

SUN, X.; ZHANG, H.; DUAN, H. 3D Computerized Segmentation of Lung Volume With Computed Tomography. **Academic Radiology**, v. 13, n. 6, p. 670–677, 2006.

SUSOMBOON, P.; MANEERAT, Y.; DEKUMYOY, P.; KALAMBAHETI, T.; IWAGAMI, M.; KOMAKI-YASUDA, K.; KAWAZU, S. ichiro; TANGPUKDEE, N.; LOOAREESUWAN, S.; KANO, S. Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 107–112, 2006.

SUZUKI, R.; NAKAMURA, Y.; CHIBA, S.; MIZUNO, T.; ABE, K.; HORII, Y.; NAGASHIMA, H.; TANITA, T.; YAMAUCHI, K. Mitigation of tight junction protein dysfunction in lung microvascular endothelial cells with pitavastatin. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, p. 27–35, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2016.04.003>>.

SZIGETI, K.; HORVÁTH, I.; VERES, D. S.; MARTINECZ, B.; LÉNÁRT, N.; KOVÁCS, N.; BAKCSA, E.; MÁRTA, A.; SEMJÉNI, M.; MÁTHÉ, D.; DÉNES, Á. A novel SPECT-based approach reveals early mechanisms of central and peripheral inflammation after cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 35, n. 12, p. 1921–1929, 2015.

TADDEI, A.; GIAMPIETRO, C.; CONTI, A.; ORSENIGO, F.; BREVIARIO, F.; PIRAZZOLI, V.; POTENTE, M.; DALY, C.; DIMMELER, S.; DEJANA, E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 8, p. 923–934, 2008.

TANGPUKDEE, N.; DUANGDEE, C.; WILAIRATANA, P.; KRUDSOOD, S. Malaria diagnosis: A brief review. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 93–102, 2009.

TAOUFIQ, Z.; GAY, F.; BALVANYOS, J.; CICERON, L.; TEFIT, M.; LECHAT, P.; MAZIER, D. Rho Kinase Inhibition in Severe Malaria: Thwarting Parasite-Induced Collateral Damage to Endothelia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 7, p. 1062–1073, 2008.

THEVENIN, A. F.; KOWAL, T. J.; FONG, J. T.; KELLS, R. M.; FISHER, C. G.; FALK, M. M. Proteins and Mechanisms Regulating Gap-Junction Assembly, Internalization, and Degradation. **Physiology**, v. 28, n. 2, p. 93–116, 2013.

TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. Multifunctional strands in tight junctions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 4, p. 285–293, 2001.

UNGER, R. E.; KRUMP-KONVALINKOVA, V.; PETERS, K.; JAMES KIRKPATRICK, C. In vitro expression of the endothelial phenotype: Comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. **Microvascular Research**, v. 64, n. 3, p. 384–397, 2002.

VAL, F.; MACHADO, K.; BARBOSA, L.; SALINAS, J. L.; SIQUEIRA, A. M.; ALECRIM, M. G. C.; DEL PORTILLO, H.; BASSAT, Q.; MONTEIRO, W. M.; LACERDA, M. V. G. Respiratory complications of plasmodium vivax malaria: Systematic review and meta-analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 733–743, 2017.

VAN DEN STEEN, P. E.; DEROOST, K.; DECKERS, J.; VAN HERCK, E.; STRUYF, S.; OPDENAKKER, G. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 346–358, 2013.

VAN DEN STEEN, P. E.; GEURTS, N.; DEROOST, K.; VAN AELST, I.; VERHENNE, S.; HEREMANS, H.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, n. 9, p. 957–968, 2010.

VAN DOOREN, G. G.; MARTI, M.; TONKIN, C. J.; STIMMLER, L. M.; COWMAN, A. F.; MCFADDEN, G. I. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of Plasmodium falciparum. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 405–419, 2005.

VENTURE, M. for malaria. Da malária grave. 2013.

VERGANI, G.; CRESSONI, M.; CRIMELLA, F.; L'ACQUA, C.; SISILLO, E.; GURGITANO, M.; LIGUORI, A.; ANNONI, A.; CARRAFIELLO, G.; CHIUMELLO, D. A Morphological and Quantitative Analysis of Lung CT Scan in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome and in Cardiogenic Pulmonary Edema. **Journal of Intensive Care Medicine**, 2017.

VERHEIJDEN, K. A. T.; HENRICKS, P. A. J.; REDEGELD, F. A.; GARSSSEN, J.; FOLKERTS, G. Measurement of airway function using invasive and non-invasive methods in mild and severe models for allergic airway inflammation in mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 AUG, n. August, p. 1–9, 2014.

VIANA, W. N. Síndrome de Angústia Respiratória Aguda após Berlim. **Pulmão**, v. 24, n. 21, p. 31–35, 2015.

VIEIRA SRR. Tomografia computadorizada na insuficiência respiratória aguda. **J Pneumol 25(5) – set-out de 1999**, v. 25, n. 13, p. 294–298, 1999.

VINCENT, P. a; XIAO, K.; BUCKLEY, K. M.; KOWALCZYK, A. P.; PETER, a; ANDREW, P. VE-cadherin : adhesion at arm ' s length. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 286, n. 5, p. 987–997, 2004.

VOELKER, M. T.; FICHTNER, F.; KASPER, M.; KAMPRAD, M.; SACK, U.; KAISERS, U. X.; LAUDI, S. Characterization of a double-hit murine model of acute respiratory distress syndrome. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 41, n. 10, p. 844–853, 2014.

VOLTARELLI, J. C. Febre E Inflamacao. **Medicina**, v. 27, n. 1–2, p. 7–48, 1994.

WACHTEL, M.; FREI, K.; EHLER, E.; FONTANA, a; WINTERHALTER, K.; GLOOR, S. M. Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition. **Journal of cell science**, v. 112 (Pt 2, p. 4347–56, 1999.

WELLS, T.; BURROWS, J. N.; BAIRD, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of Plasmodium vivax: the hidden obstacle to malaria elimination. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 145–151, 2010.

WHO. **World Malaria Report 2017**. [s.l: s.n.]

WITTCHEM, E. S.; HASKINS, J.; STEVENSON, B. R. Protein Interactions at the Tight Junction. **The Journal of Cell Biology**, v. 274, n. 49, p. 35179–35185, 1999.

WOLF, S. J.; RESKE, A. P.; HAMMERMÜLLER, S.; COSTA, E. L. V.; SPIETH, P. M.; HEPP, P.; CARVALHO, A. R.; KRASSLE, J.; WRIGGE, H.; AMATO, M. B. P.; RESKE, A. W. Correlation of lung collapse and gas exchange - A computer tomographic study in sheep and pigs with atelectasis in otherwise normal lungs. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–15, 2015.

YAMAZAKI, Y.; UMEDA, K.; WADA, M.; NADA, S.; OKADA, M.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. ZO-1- and ZO-2-Dependent Integration of Myosin-2 to Epithelial Zonula Adherens. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 2, p. 3801–3811, 2008.

ZHANG, C. Gap junctions in olfactory neurons modulate olfactory sensitivity. TL - 11. **BMC**

neuroscience, v. 11 VN-r, p. 108, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-11-108>>.

ZIHNI, C.; MILLS, C.; MATTER, K.; BALDA, M. S. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 564–580, 2016a.

ZIHNI, C.; MILLS, C.; MATTER, K.; BALDA, M. S. Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 564–580, 2016b.

ZOMPATORI, M.; CICCARESE, F.; FASANO, L. Overview of current lung imaging in acute respiratory distress syndrome. **European Respiratory Review**, v. 23, n. 134, p. 519–530, 2014.

Anexo 1: Terminologia específica aplicada na caracterização das estruturas pela técnica de tomografia computadorizada

Terminologia Tomográfica	Implicações clínicas	Referências
Unidades de Hounsfield – HU (do inglês: Hounsfield units)	Escala de cinzas utilizada nas avaliações radiológicas ou tomográficas, para determinar as densidades dos tecidos a partir da absorção do raio-x pelo organismo.	(HOUNSFIELD G.N, 1973)
Atenuação de consolidação	Substituição do ar dos espaços aéreos por um produto patológico qualquer, que pode ser transudato, exsudato, sangue, produto de acúmulo (gordura, proteína, etc.) ou células inflamatórias.	(MARCHIORI et al., 2005)
Atenuação de vidro fosco	Redução da aeração dos espaços aéreos, seja por comprometimento dos interstícios ou por preenchimento parcial dos espaços aéreos; ou, alternativamente, por colapso parcial dos espaços aéreos, por inspiração insatisfatória. Embora seja habitualmente indicativa de um processo inflamatório potencialmente reversível, em alguns casos pode estar associada a fibrose pulmonar.	(SILVA et al., 2010)
Atenuação de reticulação	Aumento na espessura do septo interlobular, usualmente causado por infiltração celular ou fibrose.	Souza et., 2002
Infiltrado bilateral difuso	Acúmulo de líquidos com envolvimento de todos os campos pulmonares sem áreas predominantes/ou lóbulos.	(FIORETTO; DE CARVALHO, 2013)
Voxel	Pixel em três dimensões medida utilizada para avaliar volumes tridimensionais	(ROUBY et al., 2003)
Opacificação pulmonar	Diminuição da absorção do raio-x pela estrutura pulmonar mostrando-se como áreas mais claras “branco” com menor densidade de ar. É definida quando não é possível classificar como vidro fosco ou consolidação.	(SILVA et al., 2010)
Densitovolumetria	Avaliação das estruturas pulmonares de acordo com a densidade pela escala de cinzas das unidades de Hounsfield.	(FALLIS, 2013)
Tecidos hiperinflados	Região pulmonar basicamente composta pelo ar com volumes superiores a <90% de aeração devido a superdistensão (pontos de corte: -900 à -1.000HU).	(PESENTI et al., 2016)

Anexo 1 – Continuação da tabela

Tecidos normalmente aerados	Tecido pulmonar com alta quantidade de ar e parênquima pulmonar, com aspecto saudável e perfusão e ventilação normais (pontos de corte: -900 à -500HU).	(RESKE et al., 2011)
Tecidos pobremente aerado	Regiões pulmonares com baixa quantidade de ar que podem ser relacionadas com a atenuação de vidro fosco.	(WOLF et al., 2015)
Tecidos não aerados	Ausência de ar no tecido pulmonar, sendo composto por parênquima e/ou efusão pleural.	(VERGANI et al., 2017)
Radiofármacos	São compostos utilizados como marcadores teciduais sem característica farmacológica conjugados com os radionuclídeos e podem ser aplicados no diagnóstico clínico ou terapia.	(ARAÚJO, 2005)
Radionuclídeo	São radioisótopos produzidos artificialmente a partir de reatores nucleares, possuem tempo meia vida curta, por isso são amplamente aplicados em medicina nuclear. Apresenta duas classificações emissores de radiação gama (tempo de meia vida de horas) ou emissores de pósitrons (tempo de meia vida de segundos à minutos).	(BARBOSA; BOLOGNESI, 2013)
Radiação gama	Os raios γ (gama) é um tipo de radiação electromagnética produzida em processos de decaimento nuclear e possui alto poder penetrante, entretanto, apresenta o menor poder ionizante. Existem 3 tipos de radiação alfa, beta e gama, que são diferentes pela capacidade de atravessar os tecidos e se acumular. Em medicina nuclear a radiação gama é utilizada em diagnósticos por imagem.	(LIMA, 2014)
Emissores de radiação gama	São radionuclídeos que após seu decaimento emitem radiação gama como por ex: Tc^{99} , I^{123} , Ga^{67} , Tl^{201} sendo amplamente utilizados no diagnóstico clínico.	(LIMA, 2014)
Emissores de pósitrons (β^+)	São radionuclídeos que após seu decaimento emitem positrons por ex: ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F	(BARBOSA et al., 2013)
Tecnécio 99 metaestável	Até o momento, todos os isótopos conhecidos do tecnécio são radioativos, desde o tecnécio-90 ao tecnécio-110, e incluem oito pares de isômeros nucleares, entre eles Tc^{99} metaestável. O nuclídeo no estado mais energético (metaestável), libera energia eletromagnética (radiação gama) na transição para um estado isomérico de energia mais baixa.	(ISITMAN et al., 1988)

Anexo 2: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária 'Aramando de Salles Oliveira', Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Estudo da permeabilidade vascular e das junções interendoteliais na malária experimental*", registrado sob o protocolo nº **5/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **27/03/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Sabrina Epiphânio**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Thatyane de Castro Quirino (Pós-graduando), Cláudio Romero Farias Marinho (Credenciado PG)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Study of vascular permeability and interendothelial junctions in experimental malaria*", protocol nº **5/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **3/27/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Sabrina Epiphânio**

- Team members: *Thatyane de Castro Quirino (Graduate Student), Cláudio Romero Farias Marinho (Graduate Supervisor)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	DBA/2	Macho/male	20 g	177

São Paulo, 03 de abril de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP

Anexo 2.1: Aditivo do certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.154.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº 005/2017/CEUA, aprovado em 27/03/2017, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo "*Estudo da permeabilidade vascular e das junções interendoteliais na malária experimental*", de responsabilidade da Profa. Dra. **Sabrina Epiphânio**, do Departamento de Imunologia, conforme descrição da solicitação:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Camundongo	DBA/2J	Macho	6-8 semanas	45

São Paulo, 25 de setembro de 2018.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Anexo 3: Ciência da CEUA/FCF da aprovação do estudo no CEUA do ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

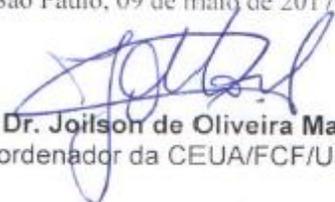
Ofício CEUA/FCF 30.2017

CIÊNCIA

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em reunião realizada em 05/05/2017, tomou ciência da pesquisa **Estudo da permeabilidade vascular e junções interendoteliais na malária experimental**, conforme aprovada pela CEUA do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CEUA 5/2017, de 03/04/2017), conforme certificado assinado em 03/04/2017.

Orientador(a): **Profa. Dra. Sabrina Epiphânio**
Pesquisador(a): **Thatyane de Castro Quirino**

São Paulo, 09 de maio de 2017.


Prof. Dr. Jaitson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Anexo 4: Protocolo de imunofluorescência para caracterização das células endoteliais pulmonares primárias

Protocolo	vWF *	eNOS *	CD31*	ACE*	CD62E *	ULEX #
Fixação:	§ Formaldeído 3,7% em PBS 1x (10 minutos a temperatura ambiente Lote: 01F1020.01.AP					
Permeabilização e bloqueio:	§ Acetona -20°C por 5 min e BSA 1% em PBS por 1 hora a temperatura ambiente Lote: A1017.01.BJ					
Anticorpo primário:	ab ab6994 vWF 1/1 overnight a 4°graus; Lote: GR170975-25	ab 1177 eNOS 1/100 overnight a 4°graus; Lote: 8715	ab 28364 CD31 1/100 overnight a 4°graus; Lote: GR212364-2	ab 85955 ACE 1/100 overnight a 4°graus; Lote: GR7236-1	ab 18981 CD62E 1/100 overnight a 4°graus; Lote: GR190124-6	L9006-1mg Ulex 1/100 overnight a 4°graus; Lote: 072M4026V
Anticorpo secundário:	*Alexa Flúor® 488 (ab150077) 1/400 por 1 hora;					
Corante nuclear	* Hoechst (ab 33342) 1/1000 por 5 min;					

* ABCAM

Sigma

\$ Synty

Anexo 5: Protocolo de imunofluorescência das junções interendoteliais

Protocolo	Proteínas da junção interendoteliais					
	Cx43 *	OCL *	JAM-B Δ	CLDN5 Δ	VE-Caderina*	ZO-1 ¥
Fixação	4% de paraformoldeído [§] por 15 minutos	Metanol/Acetona [§] (1/1)	4% de Paraformoldeído [§] por 15 minutos		Metanol [§] -20°C por 5 minutos	4% de Paraformoldeído [§] por 15 minutos
Permeabilização	0,2% de triton [§] em PBS por 15 minutos		0,2% de triton [§] em PBS por 15 minutos		1% BSA, 10% de cavalo#, 0,3M de glycina [±] em 0,1% de PBS Twen [±] por 1 hora	0,2% de triton [§] em PBS por 15 minutos
Bloqueio	5% de soro de cavalo# e 10% de soro de cabra \pm 1/1 overnight à 4°C	1% de BSA [±] por 1 hora	5% de soro de cavalo# e 10% de soro de cabra \pm 1/1 por 2oras à 4°C			5% de soro de cavalo# e 10% de soro de cabra \pm 1/1 overnight à 4°C
Anticorpo primário	ab 11370 Cx43 1/100 overnight à 4°C Lote: gr170975-25	ab 168986 OCL 1.5mg/ml overnight à 4°C Lote: gr297407-2	PA5-21576 JAM2 1/100 overnight à 4°C Lote:SF2406131C	34-1600 CLDN5 1/100 overnight à 4°C Lote: SC249265	Ab 33168 VE-CAD 2,5mg/ml overnight à 4°C Lote: gr2853131	D6L1E ZO-1 1/100 overnight à 4°C Lote: 13663
Anticorpo secundário	Alexa Fluor® 488* ab 150077 1/400 por 1 hora					
Corante nuclear	Hoechst®* ab 33342 1.1000 por 5 minutos					

* ABCAM; ¥ Cellsignal; Δ Thermo Scientific

\pm Life Ref: 50062Z Lote: 1857903A

Sigma Ref: MFCD00164115 Lote: H1138

§ Synth

± BIORAD

\neq INLAB

Anexo Obrigatório: Ficha do aluno obtido do sistema JANUS

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 9610699/1 - Thatyane de Castro Quirino

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ICB5720-1/6	Curso de Proteção Radiológica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	06/03/2017	12/03/2017	15	1	100	A	N	Concluída
BMH5752-5/4	Fundamentos em Biologia Tecidual (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	06/03/2017	18/06/2017	225	15	100	A	N	Concluída
FBC5793-13/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	07/03/2017	19/06/2017	15	1	100	A	N	Concluída
MCM5880-3/5	Bioestatística I (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	14/03/2017	24/04/2017	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5705-5/1	Tópicos em Microscopia Quantitativa	04/04/2017	17/04/2017	30	0	-	-	N	Turma cancelada
MCM5830-5/2	Mecanismos Imunopatológicos nas Doenças Parasitárias (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	01/06/2017	28/06/2017	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5780-2/4	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	07/08/2017	17/09/2017	90	6	90	B	N	Concluída
FBC5757-8/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	15/08/2017	27/11/2017	15	1	80	A	N	Concluída
MCP5772-4/2	Estudo Aprofundado da Fisiopatologia da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	21/08/2017	27/08/2017	15	1	100	A	N	Concluída
ICB5752-1/3	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	16/10/2017	29/10/2017	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 11/11/2018 13:22:55