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

AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E DA BARREIRA ENDOTELIAL
PULMONAR NA MALÁRIA EXPERIMENTAL

Daniela Debone

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sabrina Epiphânio

São Paulo
2017

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

AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E DA BARREIRA ENDOTELIAL
PULMONAR NA MALÁRIA EXPERIMENTAL

Daniela Debone

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sabrina Epiphânio

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Debone, Daniela

D287a Avaliação do citoesqueleto e da barreira endotelial pulmonar
na malária experimental / Daniela Debone. -- São Paulo, 2017.
105p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia
Orientador : Epiphanio, Sabrina

1. Doenças parasitárias 2. Malária 3. Citoesqueleto 4. Células
endoteliais I. T. II. Epiphanio, Sabrina, orientador.

616.96 CDD

Daniela Debone

AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E DA BARREIRA ENDOTELIAL
PULMONAR NA MALÁRIA EXPERIMENTAL

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof.^a Dr.^a Sabrina Epiphanyo
orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017

RESUMO

Debone, D. **AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E DA BARREIRA ENDOTELIAL PULMONAR NA MALÁRIA EXPERIMENTAL.** 2017. 105p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017

Infecções por *Plasmodium* sp. podem levar a um quadro respiratório grave, com complicações pulmonares denominadas lesão pulmonar aguda e síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA). Inflamação aguda, lesão do endotélio alveolar e do parênquima pulmonar, disfunção e aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e, consequente, formação de edema, caracterizam esta síndrome. O modelo experimental, que utiliza o parasita murino *Plasmodium berghei* ANKA e camundongos da linhagem DBA/2, é empregado no estudo de mediadores imunológicos e fatores que propiciam o estabelecimento das lesões pulmonares associados à LPA/SDRA. Diversos estímulos podem atuar diretamente no aumento da permeabilidade endotelial por meio da desestabilização dos microtúbulos, rearranjo dos microfilamentos de actina e contração das células endoteliais, via sinalização de Rho-GTPases, causando disfunção da barreira endotelial. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações do citoesqueleto em células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2), as vias de sinalização das principais Rho-GTPases e o estresse oxidativo, causados pela presença de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA (EP-PbA). As CEPP-DBA/2 foram estimuladas com TNF, VEGF ou IFN γ , em diferentes tempos de exposição, seguido da incubação com EP-PbA. Assim, foram realizados ensaios de imunofluorescência para análise do rearranjo de microfilamentos de actina e da desestabilização de microtúbulos. As vias de sinalização das Rho-GTPases foram avaliadas por Western blot, para as expressões proteicas de RhoA, Cdc42 e MLC. Além disso, ensaio fluorométrico foi realizado para detectar a produção de espécies reativas de oxigênio, resultantes do estímulo com eritrócitos parasitados. CEPP-DBA/2 estimuladas por EP-PbA, VEGF, TNF ou IFN γ , em associação ou não, apresentaram alterações morfológicas nos microfilamentos de actina e aumento dos espaços interendoteliais. Imagens de imunofluorescência também mostram desestabilização de microtúbulos e desfosforilação de FAK, causadas por EP-PbA. Os ensaios de permeabilidade validam que os eritrócitos parasitados com formas maduras de *P. berghei* induziram aumento da permeabilidade microvascular nas CEPP-DBA/2. Além disso, estas células, estimuladas com EP-PbA, demonstraram elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que pode estar contribuindo com o desenvolvimento de estresse oxidativo e com a injúria endotelial, assim como, com o aumento da permeabilidade vascular. O mais interessante é que estas alterações endoteliais podem estar relacionadas ao aumento da razão RhoA/Cdc42, da expressão proteica de MLC fosforilada e do sinal de ativação de RhoA. Em conjunto, estes resultados mostram envolvimento dos eritrócitos parasitados com esquizontes de *Plasmodium berghei* ANKA na desorganização do citoesqueleto e na disfunção da barreira alvéolo-capilar, via RhoA/Rho-kinase, o que pode estar contribuindo com a patogênese da LPA/SDRA associada à malária.

Palavras-chave: LPA/SDRA, malária, citoesqueleto, RhoA/Rho-kinase, células endoteliais, permeabilidade vascular

ABSTRACT

Debone, D. **EVALUATION OF THE CYTOSKELETON AND PULMONARY ENDOTHELIAL BARRIER IN EXPERIMENTAL MALARIA.** 2017. 105p. Dissertation (Master) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2017

Infections by *Plasmodium* sp. can lead to a serious respiratory condition with pulmonary complications, named acute lung injury and acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS). Acute inflammation, alveolar endothelium and lung parenchyma injuries, dysfunction and increased permeability of the pulmonary alveolar-capillary barrier and consequent formation of edema characterize this syndrome. Several stimuli can directly increase endothelial permeability through actin microfilaments rearrangement, via Rho-GTPases signaling, leading to endothelial barrier dysfunction. DBA/2 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA develop ALI/ARDS similar to that observed in humans. The purpose of this research was to assess cytoskeletal changes in DBA/2 mice primary microvascular lung endothelial cells (PMLEC), verify the signaling pathways of the Rho-GTPases and analyze the oxidative stress on these cells in the presence of *P. berghei* ANKA-infected red blood cells (PbA-iRBC). PMLEC were stimulated by TNF, VEGF or IFN γ followed by incubation with PbA-iRBC. Immunofluorescence assays were performed to analyze actin microfilaments rearrangement and microtubules destabilization. Western blot for RhoA, Cdc42 and MLC proteins were conducted to assess alterations in signaling pathways of Rho-GTPases. In addition, a fluorimetric assay was performed to detect the production of reactive oxygen species resulting from PbA-iRBC stimulus. *P. berghei* ANKA, VEGF, TNF and IFN γ stimuli, in association or not, caused morphological disturbances in actin microfilaments of PMLEC and an increase of intercellular spaces. Moreover, immunofluorescence images showed microtubules destabilization and FAK dephosphorylation in these cells, caused by PbA-iRBC. The permeability assay showed that PbA-iRBC induced an increase of microvascular permeability in PMLEC. In addition, PMLEC stimulated by PbA-iRBC, showed elevated production of ROS, which may be contributing to oxidative stress and increasing the damage of endothelial cells, as well as an increase of vascular permeability. Interestingly, these endothelial changes may be related to the increased RhoA/Cdc42 protein expressions ratio, augmented protein expression of phosphorylated MLC and RhoA activation signal. Taken together, these data demonstrate the involvement of *P. berghei* ANKA-infected red blood cells in cytoskeleton disorganization and alveolar-capillary barrier dysfunction, through of RhoA / Rho-kinase signaling pathway, which may contribute to ALI/ARDS pathogenesis.

Keywords: ALI/ARDS, malaria, cytoskeleton, RhoA/Rho-kinase, endothelial cells, vascular permeability

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Malária	8
1.2 O modelo murino para LPA/SDRA	10
1.3 O endotélio, o citoesqueleto e o papel das Rho-GTPases.....	12
1.4 Espécies reativas de oxigênio	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivos específicos.....	21
3. CONCLUSÕES.....	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença infecciosa parasitária. É considerada um problema de saúde pública e representa risco para as mais diversas populações, especialmente para aquelas localizadas em áreas tropicais e subtropicais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015; COWMAN et al., 2016). Estima-se que 3,2 bilhões de pessoas vivem em risco de infecção. Só em 2015, foram registrados 214 milhões de casos da doença e 438 mil óbitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

O *Plasmodium* sp., patógeno causador da malária, é um protozoário que possui complexo ciclo de vida, com diversos estágios que alternam entre a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* e hospedeiros vertebrados (COWMAN et al., 2016).

Após repasto sanguíneo, o mosquito introduz esporozoítos na derme do hospedeiro. Uma vez na corrente sanguínea, estes alcançam rapidamente o fígado, onde atravessam hepatócitos e células de *kupffer* (MILLER et al., 2002; VAN DOOREN et al., 2005; COWMAN et al., 2016). Ao se estabelecer no hepatócito, os esporozoítos se dividem, por esquizogonia, dando origem a milhares de merozoítos, abrigados em vesículas, denominadas merossomas. Estas são lançadas na corrente sanguínea, rompem-se e liberam os merozoítos, que invadirão os eritrócitos do hospedeiro (MILLER et al., 2002; VAN DOOREN et al., 2005; COWMAN et al., 2016).

Dentro do eritrócito, o parasita se desenvolve, no interior de um vacúolo parasitóforo, alimentando-se de hemoglobina, sofre novamente esquizogonia, originando mais milhares de parasitas, que poderão invadir novos eritrócitos. Após algumas gerações de merozoítos, alguns podem se diferenciar em formas sexuadas, os gametócitos, que seguirão seu desenvolvimento, apenas ao serem inoculados por outro mosquito. Os sintomas da doença manifestam-se somente na fase eritrocítica, durante as sequências de esquizogonia (MILLER et al., 2002; VAN DOOREN et al., 2005; COWMAN et al., 2016).

As infecções causadas por *Plasmodium falciparum* são responsáveis pelo maior número de casos severos e fatais, nos trópicos (COWMAN et al., 2016; WASSMER; GRAU, 2016). A capacidade de citoaderência do parasita e consequente sequestro na microvasculatura do hospedeiro, podem resultar em obstrução do fluxo sanguíneo e disfunção de órgãos vitais, processos-chave para o desenvolvimento de malária severa (OBERLI et al., 2016; WASSMER; GRAU, 2016).

A virulência do *P. falciparum* é determinada por vários fatores, tais como as proteínas que estão presentes na superfície de eritrócitos parasitados (EPs) (SMITH et al.,

2013; OBERLI et al., 2016). Estas permitem a conexão dos EPs ao endotélio microvascular de diversos órgãos e tecidos, durante o curso da infecção (GILLRIE et al., 2016; OREGAN et al., 2016; WASSMER; GRAU, 2016). A proteína 1 de membrana eritrocitária do *P. falciparum* (PfEMP1) é a principal envolvida no controle da adesão dos EPs, por meio da ligação específica a diversos receptores em monocamadas de células endoteliais (SMITH et al., 2013; GILLRIE et al., 2016; OBERLI et al., 2016), tais como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão neuronal celular (NCAM), E-selectina, CD36, CD31, receptor de proteína C e sulfato de condroitina A, este último, no caso de malária placentária (SMITH et al., 2013; OBERLI et al., 2016; OREGAN et al., 2016; WASSMER; GRAU, 2016).

Esta ligação ao endotélio resulta em sequestro generalizado de EPs, o que provoca ativação endotelial, bem como respostas pró-inflamatórias e pró-coagulantes (SMITH et al., 2013; WASSMER; GRAU, 2016). Além disso, o sequestro de EPs promove o desaparecimento das formas assexuadas do parasita da circulação periférica, evitando que os mesmos sejam destruídos no baço (POUVELLE et al., 2000; MILLER et al., 2002).

As principais complicações observadas da malária grave são acidose metabólica, anemia grave, hemorragias, disfunções hepáticas e renais, malária placentária, malária cerebral e complicações pulmonares. Estas, cada vez mais observadas em pacientes infectados, podem ser denominadas como lesão pulmonar aguda ou síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; LAGASSE et al., 2016).

Nos últimos anos, foram registrados diversos casos de LPA/SDRA associada à malária, em diferentes países (TAYLOR et al., 2012; GUPTA et al., 2015; PUNSAWAD et al., 2015). Em crianças africanas hospitalizadas com malária grave causada por *P. falciparum*, a incidência de LPA/SDRA pode variar entre 7 % e 16 % (TAYLOR et al., 2012). Além disso, foram reportados que elevada porcentagem de pacientes adultos e de mulheres grávidas desenvolveram LPA/SDRA, mesmo após administração de tratamento com antimaláricos (CAHAYANI et al., 2016; LAGASSE et al., 2016).

Sabe-se também que as cinco espécies que infectam seres humanos, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, estão relacionadas ao desenvolvimento do quadro de lesão pulmonar aguda e síndrome do desconforto respiratório agudo (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; COX-SINGH et al., 2010; HAYDOURA et al., 2011; TAYLOR et al., 2012).

A LPA/SDRA é caracterizada por inflamação aguda e lesão do endotélio alveolar e do parênquima pulmonar. Além disso, observa-se disfunção e aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar pulmonar e, conseqüentemente, formação de edema. A diminuição da capacidade de trocas gasosas e o aumento de mediadores inflamatórios nos pulmões resultam em insuficiência respiratória em pacientes críticos, podendo levá-los ao óbito (ANSTEY et al., 2002; GOODMAN et al., 2003; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

Embora as manifestações clínicas da LPA/SDRA tenham sido descritas há muito tempo, os mecanismos celulares e moleculares que conduzem a este quadro ainda não estão completamente esclarecidos. Além disso, a mortalidade de pacientes permanece elevada nas unidades de terapia intensiva e, ainda, não se conhece formas de diagnóstico precoce que permitam um tratamento efetivo e evite a morte de pacientes (GOOD et al., 2005; MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008).

1.2 O modelo murino para LPA/SDRA

Nos últimos anos, apresenta-se crescente o uso de modelos experimentais para aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares da doença e testar possíveis intervenções e tratamentos para LPA/SDRA associada à malária (VAN DEN STEEN et al., 2013; AITKEN et al., 2014; SERCUNDES et al., 2016).

As espécies *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* e *P. vinckei*, que infectam roedores, são as principais utilizadas como modelos experimentais para a malária humana (LACERDA-QUEIROZ; TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2008; NIIKURA; INOUE; KOBAYASHI, 2011; DEROOST et al., 2016). Diferentes combinações entre essas espécies de *Plasmodium* sp. e linhagens de camundongos, tais como, C57Bl/6, BALB/c, CBA e DBA/2 permitem a compreensão de diversos mecanismos da patogênese da malária grave (LACERDA-QUEIROZ; TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2008; NIIKURA; INOUE; KOBAYASHI, 2011; DEROOST et al., 2016).

Na literatura, encontra-se alguns modelos murinos que já foram propostos para estudos da LPA/SDRA associada à malária. Van den Steen e colaboradores, em 2010, propuseram um modelo experimental, com a combinação entre o parasita *P. berghei* NK65 e camundongos da linhagem C57Bl/6, que mostra o aumento do peso dos pulmões, edema pulmonar e formação de membrana hialina (VAN DEN STEEN et al., 2010). Trata-se de um modelo experimental de alto impacto, porém, seus resultados não apresentaram reprodutibilidade, quando testados por nossa equipe de laboratório.

Em 2011, foi proposto o modelo murino que leva a associação entre o parasita *P. berghei* K173 e camundongos da linhagem C57Bl/6. Neste trabalho, demonstra-se um leve quadro de comprometimento pulmonar, em que os animais apresentam edema pulmonar, congestão dos capilares com eritrócitos e presença de leucócitos nos pulmões (HEE et al., 2011).

Em 2013, foi publicado um trabalho que utiliza a combinação entre o parasita *P. berghei* ANKA e camundongos da linhagem C57Bl/6, também para estudar LPA/SDRA (SOUZA et al., 2013). Entretanto, esta associação trate-se de um modelo experimental já estabelecido, e muito bem delineado, para estudos sobre os mecanismos da patogênese da malária cerebral (FAVRE et al., 1999; CLARK et al., 2005; PATEL et al., 2008; VILLEGAS-MENDEZ et al., 2012; FREEMAN et al., 2016).

Recentemente, nosso laboratório descreveu um modelo experimental preditivo para o estudo da LPA/SDRA associada à malária que valida que, em média, 50% dos camundongos machos da linhagem DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA apresentam hipóxia, infiltrado inflamatório, edema e membrana hialina nos pulmões, além de opacidade torácica, comprovada por exames radiográficos (EPIPHANIO et al., 2010; 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, culminam na morte dos camundongos por insuficiência respiratória (EPIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014).

Além disso, os pulmões dos camundongos que vieram ao óbito com LPA/SDRA apresentaram perfil patológico totalmente diferente, quando comparados com os pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, associação utilizada como modelo experimental para malária cerebral (EPIPHANIO et al., 2010).

A utilização de modelos murinos foi fundamental na discussão de que a participação de diversos fatores, tais como neutrófilos, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), interferon gama (IFN γ), plaquetas, hemozoína e sequestro de EPs dependente de CD36, pode estar contribuindo com o desenvolvimento da doença (YAMADA, 2004; EPIPHANIO et al., 2010; AITKEN et al., 2014). Além do envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 β e TGF- β , para o aumento da permeabilidade vascular, o dano tecidual e o estresse oxidativo nos pulmões (LUCAS et al., 2009; VAN DEN STEEN et al., 2010).

Além disso, em 2016, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a indução da heme-oxigenase-1 (enzima com atividade anti-inflamatória e anti-apoptótica), a partir do

tratamento com hemina, em células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2) estimuladas com lisado *P. berghei* ANKA, reduz a permeabilidade vascular, indicando a ação protetora desta droga sobre os efeitos lesivos no endotélio microvascular dos pulmões, causados pelo lisado do parasita (PEREIRA et al., 2016).

1.3 O endotélio, o citoesqueleto e o papel das Rho-GTPases

O endotélio pulmonar, barreira celular semipermeável entre o compartimento vascular e o interstício, é formado por uma monocamada de células endoteliais (CEs) que recobre os vasos sanguíneos. Apresenta participação crítica nos processos de coagulação e de formação de novos vasos, na ventilação e na otimização de trocas gasosas, nas respostas imunológicas e na regulação da permeabilidade vascular (STAN RADU V., ; GIANNOTTA; TRANI; DEJANA, 2013). Em condições fisiológicas equilibradas, as junções interendoteliais abrem-se dinamicamente para permitir a passagem de pequenas moléculas e células inflamatórias, pela monocamada de CEs, mantendo a vigilância imunológica e a homeostase do tecido (SUKRITI et al., 2014).

O transporte através do endotélio pode ocorrer por duas diferentes vias: através da célula endotelial (transcelular) ou entre células adjacentes, pelas junções interendoteliais (paracelular). A via transcelular, também conhecida por transcitose, é responsável pelo transporte de macromoléculas, mediado por vesículas. Já na via paracelular, a passagem de moléculas é regulada por uma interação complexa entre as proteínas juncionais e os motores actinmiosina (VANDENBROUCKE et al., 2008; SUKRITI et al., 2014).

A integridade das células endoteliais pulmonares, cuja manutenção é regulada por fatores trombóticos, inflamatórios e, principalmente, por elementos do citoesqueleto, é um requisito fundamental para a preservação da função pulmonar (STAN RADU V., ; GIANNOTTA; TRANI; DEJANA, 2013).

As células endoteliais são amplamente utilizadas como modelo experimental de várias funções celulares, tais como, migração, polarização celular e interações intercelulares. Além disso, são utilizadas para estudo das estruturas associadas ao citoesqueleto e suas interações e, principalmente, para pesquisa das disfunções endoteliais (SHAKHOV; VERIN; ALIEVA, 2014).

A cultura de CEs preserva, *in vitro*, a morfologia, a bioquímica e a fisiologia do endotélio, ou seja, reproduz muito bem propriedades e características que são observadas no organismo. Do ponto de vista funcional e morfológico, este modelo é o mais

aceito para estudos de processos fisiológicos, interações e estrutura do citoesqueleto (ALIEVA, IRINA B., 2013; SHAKHOV; VERIN; ALIEVA, 2014).

No endotélio, quando ocorre uma perturbação, a permeabilidade vascular pode ser aumentada por diversos fatores inflamatórios, tais como histamina, bradicinina, fator de ativação plaquetária, citocinas, leucócitos ativados, além de produtos de glicação e espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses mediadores induzem uma infinidade eventos de sinalização intracelular que comprometem a integridade da barreira endotelial, uma vez que modulam a expressão de proteínas juncionais e moléculas de adesão, e atuam na reorganização do citoesqueleto e do complexo de adesão focal das CEs (VANDENBROUCKE et al., 2008; BARABUTIS; VERIN; CATRAVAS, 2016).

As respostas da permeabilidade alterada se desencadeiam pela ligação de agonistas aos receptores de superfície das CEs e, consequente, ativação de moléculas de sinalização, tais como quinases, fosfatases e proteínas da família Rho-GTPases. Estas cascatas moleculares atuam como moduladores da integridade e contratibilidade do citoesqueleto, provocando flutuações da função de barreira endotelial (SUKRITI et al., 2014; BARABUTIS; VERIN; CATRAVAS, 2016).

O citoesqueleto é formado por três principais componentes: microfilamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos (MTs). Juntos, são capazes de resistir à deformação, de se reorganizar em resposta a forças ou estímulos externos e de manter as relações espaciais entre compartimentos celulares (BIRUKOVA et al., 2004; MCKAYED; SIMPSON, 2013; PASQUIER et al., 2015).

Portanto, trata-se de um complexo sistema que regula e controla diversas funções celulares, tais como, transporte de organelas e vesículas, manutenção da forma, motilidade, diferenciação e divisão celular. Desempenha papel fundamental na angiogênese e na permeabilidade endotelial, que é regulada pelo balanço de forças contráteis e de ancoragem impostas por estes filamentos (BIRUKOVA et al., 2004; MCKAYED; SIMPSON, 2013; PASQUIER et al., 2015).

Os microtúbulos são estruturas altamente dinâmicas compostas por heterodímeros de α -tubulina e β -tubulina, que normalmente irradiam do centróssomo da célula. Os MTs estão ativos em diferentes processos celulares, tais como divisão celular, transporte intracelular e distribuição espacial de organelas, atuam alternando entre fases de crescimento e encurtamento, por adição ou remoção de subunidades de tubulina (KAVALLARIS, 2010; MCKAYED; SIMPSON, 2013).

Os filamentos intermediários (FIs) são os elementos mais diversos do citoesqueleto, possuem alta resistência mecânica, compostos por subunidades neutras de cadeias polipeptídicas de α -hélice, que muitas vezes exibem distribuições e propriedades

específicas para diferentes tipos celulares ou tecidos. Em células de origem mesodérmica, como as CEs e fibroblastos, os filamentos intermediários são compostos principalmente de vimentina. Portanto, essa composição variada permite que os filamentos intermediários respondam de maneira distinta a condições de desequilíbrio ou ao estresse físico (WANG; PELLING, 2012; MCKAYED; SIMPSON, 2013).

A actina, uma das principais proteínas componentes de células musculares e do citoesqueleto, possui uma variedade de isoformas altamente conservadas cuja distribuição nos vertebrados é tecido-específica (KHAITLINA, 2001). Pode apresentar-se na forma globular monomérica (G-actina) ou na forma filamentosa polimérica (F-actina), esta, denominada como microfilamento, é formada pela polimerização e montagem da G-actina, em forma helicoidal de duas cadeias (LI; MRUK; CHENG, 2015).

Os microfilamentos de actina conferem plasticidade às células, uma vez que é capaz de reorganizar-se, assumindo uma variedade de formas de montagem, empacotando-se, ramificando-se e, assim, fornecendo força e estrutura para motilidade e organização intracelular (KHAITLINA, 2001; MCKAYED; SIMPSON, 2013; LI; MRUK; CHENG, 2015).

Os microfilamentos de actina, associados as várias proteínas adesivas de membrana, tais como, moléculas de caderina, são essenciais para a regulação da permeabilidade das células endoteliais. Sabe-se também, que os microtúbulos e microfilamentos de actina são conhecidos por interagirem funcionalmente durante este processo celular, uma vez que a desmontagem dos microtúbulos resulta no rearranjo da actina, alterando as fibras de tensão, provocando contração celular e aumento da permeabilidade (DUDEK; GARCIA, 2001; BIRUKOVA et al., 2004).

As células endoteliais são conectadas pelas junções aderentes (*adherens junctions*), oclusivas (*tight junctions*) e comunicantes (*GAP junctions*) (**Figura 1**). As junções GAP formam um canal de comunicação entre as células por aposição de conexons, em que cada conexon é formado por 6 conexinas. Estes canais, chamados de hemicanais, proporcionam um mecanismo de comunicação célula-célula, que permite passagem de sinais elétricos e troca direta de mensageiros intracelulares, tais como cálcio, nucleotídeos e diversos metabólitos, coordenando processos, como proliferação, diferenciação e sobrevivência/morte celular. Células endoteliais expressam várias conexinas, incluindo Cx37, Cx40 e Cx43 (EUGENIN et al., 2012; NIELSEN et al., 2012; O'DONNELL et al., 2014).

Em estudo com células endoteliais da microvasculatura pulmonar de coelhos, 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 et al., 2010).

Além disso, foi validados que estímulos, tais como LPS e trombina, foram capazes de aumentar a expressão de Cx43, em células endoteliais de artéria pulmonar humana, e a modulação desta conexina pode estar influenciando a rompimento da barreira endotelial pulmonar (O'DONNELL et al., 2014).

A VE-caderina (caderina endotelial vascular), também conhecida como caderina-5, apresenta expressão elevada em células endoteliais. Específica para este tipo celular é a principal proteína estrutural das junções aderentes, onde ocorre formação de complexos, em que as proteínas da região citoplasmática, tais como β -catenina e plakoglobina, associam-se a proteínas ligadas a actina, tais como α -catenina, vinculina, α -actinina e epiplina. As junções aderentes e junções oclusivas são consideradas componentes estruturais “chave” responsáveis pela regulação da permeabilidade das células endoteliais (**Figura 1**) (ARNOLD; GOECKELER; WYSOLMERSKI, 2013; DI LORENZO et al., 2013; DULUC; WOJCIAK-STOTHARD, 2014).

Figura 1. Esquema das junções aderentes (*adherens junctions*), oclusivas (*tight junctions*) e comunicantes (*GAP junctions*) que conectam as células endoteliais e regulam a passagem de moléculas pelo endotélio (Fonte: Razakandrainibe, Romy et al. Trends in parasitology, 2012).

A interação estrutural entre as CE e as proteínas da matriz extracelular (MEC) é igualmente importante para manter a função seletiva da barreira do endotélio. Estas

células estão ancoradas à MEC por meio de integrinas conectadas ao complexo de adesão focal, que consiste em múltiplas proteínas, tais como a paxilina, talina, vinculina e a quinase de adesão focal (FAK - *focal adhesion kinase*). Este complexo é vital para formação e manutenção da monocamada endotelial, além de atuar como meio de comunicação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto (BELVITCH; DUDEK, 2012; GRINNELL; HARRINGTON, 2012; ARNOLD; GOECKELER; WYSOLMERSKI, 2013; SCHMIDT et al., 2013).

FAK é uma tirosina-quinase, citoplasmática e não receptora, integrante do complexo de adesão focal, localiza-se na região de contato célula-célula. Participa, portanto, de diversas funções endoteliais, tais como angiogênese, migração e adesão, atuando no remodelamento do citoesqueleto e na dinâmica das junções intercelulares. Sabe-se que a depleção de FAK, em camundongos, causa hiperativação de RhoA, proteína da família Rho-GTPases, provocando rompimento das junções aderentes e consequente disfunção da barreira endotelial pulmonar (BELVITCH; DUDEK, 2012; GRINNELL; HARRINGTON, 2012; ARNOLD; GOECKELER; WYSOLMERSKI, 2013; SCHMIDT et al., 2013).

A família Rho de GTPases é composta por várias proteínas de baixo peso molecular (21-25 kDA), cujos os membros mais amplamente estudados são RhoA, RhoB, RhoC, Rac1 e Cdc42. Estas proteínas são encontradas em todas as células eucarióticas, têm papel no desenvolvimento de organelas, na diferenciação e na proliferação celular, na migração celular, na apoptose, na regulação da transcrição gênica e estão envolvidas em vários aspectos dinâmicos dos microfilamentos de actina e dos microtúbulos (ALBERTS, 2008; DULUC; WOJCIAK-STOTHARD, 2014; TIAN et al., 2014).

Estas pequenas GTPases atuam como interruptores moleculares que alternam entre uma conformação ativa, ligada a guanosina trifosfato (GTP), e uma conformação inativa, ligada a guanosina difosfato (GDP). Este ciclo é regulado por três tipos de fatores citoplasmáticos: os fatores de troca de guaninas (*guanine nucleotide exchange factors* - GEFs), proteínas ativadoras de GTPases (*GTPase activating proteins* - GAPs) e os inibidores de dissociação de guaninas (*guanine nucleotide dissociation inhibitors* - GDIs). Os GEFs ativam as GTPases promovendo a liberação de GDP e a ligação ao GTP, processo que favorece a geração da forma ativa de Rho. Os GAPs convertem GTP em GDP, impedindo a interação das proteínas Rho com seus efetores. Enquanto que os GDIs ligam-se às Rho-GTPases, mantendo-as sequestradas no citoplasma, impedindo-as de serem ativadas (**Figura 2**) (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002; JAFFE; HALL, 2005; WENNERBERG; ROSSMAN; DER, 2005; GARCIA-MATA; BOULTER; BURRIDGE, 2011; RIDLEY, 2013).

Figura 2. A atividade das Rho-GTPases é controlada por fatores de troca de guaninas (GEFs), proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) e inibidores de dissociação de guaninas (GDIs). GEF ativa Rho-GTPases facilitando a liberação de GDP e a ligação ao GTP. GAP inativa Rho-GTPases promovendo hidrólise das moléculas de GTP, resultando na mudança rápida da forma ligada a GTP para a forma ligada a GDP. GDI liga-se à porção C-terminal das Rho-GTPases, mantendo-as no estado inativo.

Ativação excessiva ou anormal de RhoA e de seu efetor Rho-quinase (ROCK), por ação de TNF, VEGF, trombina e outros agentes, está associada ao decréscimo da função da barreira endotelial (BECKERS; VAN HINSBERGH; VAN NIEUW AMERONGEN, 2010; SPINDLER; SCHLEGEL; WASCHKE, 2010). Tanto RhoA quanto Rho B interagem com ROCK, aumentam a fosforilação da cadeia leve da miosina e promovem a polimerização da actina (DULUC; WOJCIAK-STOTHARD, 2014). Sabe-se também que RhoB regula a função da barreira endotelial durante a resposta inflamatória, por ativação de NF κ B (RODRIGUEZ et al., 2007).

Entretanto, Rac1 e Cdc42 possuem efeito protetor sobre a barreira endotelial, quando ativadas, inibem a atividade de RhoA. A Cdc42 também está associada à restauração das junções aderentes e ao *turnover* das VE-caderinas nas células endoteliais (KOUKLIS, 2004; SPINDLER; SCHLEGEL; WASCHKE, 2010; DULUC; WOJCIAK-STOTHARD, 2014).

Cada vez mais, estudos sugerem envolvimento direto dos microtúbulos na dinâmica de controle da permeabilidade das células endoteliais. A depolimerização dos MTs causada, por exemplo, por inibidores como vinblastina e nocodazole induz forte ativação de Rho, resultando em reorganização dos microfilamentos de actina e na contração de actino-miosina (DUDEK; GARCIA, 2001). Além disso, a desmontagem dos MTs também está ligada à ativação suplementar de Rho, induzida por trombina, TNF e TGF- β , provocando disfunção da barreira endotelial (ELIAS et al., 2012). Este cenário mostra a sinalização cruzada entre os microtúbulos e os microfilamentos de actina na regulação da permeabilidade endotelial (DUDEK; GARCIA, 2001; BIRUKOVA et al., 2004; ELIAS et al., 2012; TIAN et al., 2014).

As alterações na dinâmica de montagem e desmontagem dos MTs estão associadas ao aumento da fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC), que desencadeia alterações nos microfilamentos de actina, causando contração celular (YU et al., 2016). RhoA desempenha papel crítico na regulação da atividade da miosina fosfatase (ou fosfatase da MLC). Uma vez ativada, ligada à GTP, RhoA pode ativar o efector Rho-quinase (ROCK), que fosforila e inibe a miosina fosfatase, resultando no aumento da fosforilação de MLC, o que induz a contração da actomiosina e enfraquecimento das junções interendoteliais, causando hiperpermeabilidade vascular (SHEN et al., 2010).

Além disso, Taoufiq e colaboradores comprovaram que a adesão de eritrócitos infectados com *P. falciparum* em células endoteliais pulmonares humanas promove a ativação da sinalização de Rho-GTPases. O estudo mostra, *in vitro*, que o contato entre as células e os eritrócitos infectados causa disfunção vascular e que o tratamento com fasudil, um potente inibidor de ROCK, recupera a integridade da barreira endotelial (TAOUFIQ et al., 2008).

1.4 Espécies reativas de oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS, em inglês) são importantes constituintes da fisiologia celular, uma vez que são normalmente produzidas em resposta a diferentes estímulos endógenos e exógenos e são constantemente geradas, transformadas e consumidas durante a atividade metabólica. Sabe-se que diversos tipos celulares são capazes de produzir EROs intracelular, em níveis nanomolares (FERNANDES et al., 2006; PANIERI; SANTORO, 2015).

As células endoteliais estão constantemente expostas a uma variedade de estímulos mecânicos e bioquímicos e adaptam-se ativamente para preservar a homeostasia da função vascular. São capazes de tolerar certos níveis de EROs exógenos e sabe-se

que um aumento moderado de EROs pode favorecer a proliferação e a sobrevivência celular. Entretanto, quando a concentração de espécies reativas atinge patamares muito elevados, pode sobrecarregar a capacidade antioxidante da célula e desencadear morte celular (PANIERI; SANTORO, 2015).

Diversas condições clínicas, tais como envelhecimento, câncer, toxicidade por drogas e muitas outras, estão envolvidas com o aumento da atividade de radicais livres e com o desequilíbrio celular do balanço próxidante-antioxidante, em que oxidantes predominariam sobre antioxidantes, ocasionando potencial dano oxidativo e, consequentemente, injúria tecidual (FAVIER et al., 1995; AUGUSTO, 2006).

A desregulação da sinalização de EROs está frequentemente associada com a disfunção endotelial, contribuindo com a patogênese de doenças vasculares, tais como hipertensão, diabetes e aterosclerose. Além disso, a injúria endotelial, mediada por EROs, tem sido relacionada com desordens pulmonares, incluindo LPA/SDRA, hipertensão pulmonar e vasculite, envolvendo diferentes mecanismos, tais como a alteração da modulação de cálcio intracelular e da sinalização de kinases e fosfatases, resultando em remodelamento do citoesqueleto e aumentando a permeabilidade vascular (USATYUK et al., 2003; PANIERI; SANTORO, 2015).

Existe uma estreita relação entre a modulação de cálcio intracelular e o rearranjo do citoesqueleto, em diferentes linhagens celulares de mamíferos. A ruptura dos microfilamentos actina pode ativar os canais de membrana permeáveis ao cálcio e provocar aumento nas concentrações intracelulares de cálcio. Sabe-se que muitas proteínas, sensíveis ao Ca^{2+} , estão envolvidas na regulação da reorganização dos microfilamentos actina. Estas incluem a gelsolina, quando ativada por íons Ca^{2+} , participa da montagem e desmontagem dos microfilamentos de actina (LIN et al., 2015).

Os mecanismos de regulação da permeabilidade das células endoteliais envolvem diretamente interações dinâmicas e alterações estruturais dos componentes do citoesqueleto, principalmente microtúbulos e microfilamentos de actina, evidenciando o papel crítico do citoesqueleto na modulação da resposta inflamatória e na manutenção do endotélio pulmonar (MEHTA; MALIK, 2006; LUCAS et al., 2009; ELIAS et al., 2012).

Assim, diante da importância de aprofundar o conhecimento sobre os elementos determinantes da patogênese da LPA/SDRA associada à malária, este trabalho pretende analisar as alterações do citoesqueleto, a via de sinalização das principais Rho-GTPases e a produção de espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais pulmonares primárias, em modelo experimental murino (**Figura 3**). A compreensão dos mecanismos patológicos da LPA/SDRA associada à malária pode fornecer subsídios para

terapêuticas futuras e para a prevenção da disfunção da barreira endotelial em enfermidades pulmonares.

Figura 3. Hipótese simplificada dos mecanismos mediados pela via de sinalização de Rho-GTPases na desorganização do citoesqueleto e na ruptura da integridade da barreira endotelial, devido à interação de fatores inflamatórios e de EP-PbA com as CEPP-DBA/2 (TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; IFNγ: interferon gama; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EROs: espécies reativas de oxigênio).

2. OBJETIVOS

O modelo murino experimental valendo-se da combinação entre camundongos da linhagem DBA/2 e o plasmódio murino *Plasmodium berghei* ANKA, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (ORTOLAN et al., 2014), vem sendo utilizado no estudo de mediadores imunológicos relacionados à LPA/SDRA associada à malária, assim como na análise dos fatores que propiciam o estabelecimento das lesões pulmonares. Desta forma, neste sistema experimental que representa a doença humana, pretende-se estudar: as interações entre os eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA e

as células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 e as consequentes alterações no citoesqueleto e na permeabilidade endotelial.

2.1 Objetivos específicos

- I. As alterações do citoesqueleto de células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2), na presença de VEGF, TNF, IFN γ e eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA (EP-PbA);
- II. Aumento da permeabilidade em monocamada de CEPP-DBA/2, causado pelo contato com EP-PbA;
- III. As vias de sinalização das principais Rho-GTPases, RhoA, Cdc42 e Rac1, além da ativação de RhoA em CEPP-DBA/2, estimuladas com EP-PbA;
- IV. Quantificação de espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais primárias pulmonares murinas, causado pelo estímulo com EP-PbA.

3. CONCLUSÕES

Com base nas observações das interações do plasmódio murino *Plasmodium berghei* ANKA com as células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2, podemos concluir:

- ✓ As células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2, cultivadas e utilizadas nos diferentes ensaios deste trabalho, apresentam características específicas de células endoteliais;
- ✓ Eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA, TNF, VEGF e IFN γ , em diferentes tempos de exposição, não afetam a atividade do metabolismo mitocondrial e a viabilidade das células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2;
- ✓ Eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA provocam disfunção e aumento da permeabilidade endotelial, devido ao rearranjo espacial dos microfilamentos de actina, dos microtúbulos e da quinase de adesão focal. Estas alterações morfológicas provocam o aumento do espaço entre as junções interendoteliais;

- ✓ TNF, VEGF, IFN γ também reorganizam os microfilamentos de actina e promovem o aumento dos espaços interendoteliais, porém não amplificam esta resposta provocada pelos eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA;
- ✓ Eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA não alteram a expressão proteica de VE-caderina, mas modificam razão entre as proteínas RhoA e Cdc42 das células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2;
- ✓ A ativação de RhoA e o aumento da fosforilação da cadeia leve da miosina indicam que a adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *Plasmodium berghei* ANKA está provocando alterações na microvasculatura dos pulmões de camundongos DBA/2 pela via de sinalização RhoA/ROCK;
- ✓ O processo de adesão de eritrócitos parasitados incita a produção de espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2, sugerindo ativação endotelial anormal e disfunção celular;
- ✓ O tratamento com os antioxidantes, N-acetilcisteína e glutatona, mostrou-se eficiente na proteção contra o aumento da produção de espécies reativas, o que sugere o potencial de NAC e GSH em estratégias de terapia coadjuvante para LPA/SDRA associada a malária.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. 230, 2014. Disponível em: <<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-230>>.
- ALBERTS, B. Molecular Biology of the Cell. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, p. 1601, 2008.
- ALIEVA, IRINA B., and A. D. V. “the functional role of the microtubule/microfilament cytoskeleton in the regulation of pulmonary vascular endothelial barrier.” **endothelial cytoskeleton**. [s.l: s.n.]
- 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.

1326–1334, 2002.

ARNOLD, K. M.; GOECKELER, Z. M.; WYSOLMERSKI, R. B. Loss of focal adhesion kinase enhances endothelial barrier function and increases focal adhesions. **Microcirculation**, v. 20, n. 7, p. 637–649, 2013.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006.

BARABUTIS, N.; VERIN, A.; CATRAVAS, J. D. Regulation of pulmonary endothelial barrier function by kinases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 311, n. 5, p. L832–L845, 1 nov. 2016. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajplung.00233.2016>>.

BECKERS, C. M. L.; VAN HINSBERGH, V. W. M.; VAN NIEUW AMERONGEN, G. P. Driving Rho GTPase activity in endothelial cells regulates barrier integrity. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 103, n. 1, p. 40–55, 2010.

BELVITCH, P.; DUDEK, S. M. Role of FAK in S1P-regulated endothelial permeability. **Microvascular Research**, v. 83, n. 1, p. 22–30, jan. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026286211001580>>.

BIRUKOVA, A. a; BIRUKOV, K. G.; SMUROVA, K.; ADYSHEV, D.; KAIBUCHI, K.; ALIEVA, I.; GARCIA, J. G. N.; VERIN, A. D. Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 15, p. 1879–1890, 2004.

CAHAYANI, W. A.; NORAHMAWATI, E.; BUDIARTI, N.; FITRI, L. E. Increased CD11b and Hypoxia-Inducible Factors-1alpha Expressions in the Lung Tissue and Surfactant Protein-D Levels in Serum Are Related with Acute Lung Injury in Severe Malaria of C57BL/6 Mice. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 11, n. 3, p. 303–315, 2016.

CLARK, C. J.; MACKAY, G. M.; SMYTHE, G. A.; BUSTAMANTE, S.; STONE, T. W.; PHILLIPS, R. S. Prolonged Survival of a Murine Model of Cerebral Malaria by Kynurenine Pathway Inhibition. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 5249–5251, 1 ago. 2005. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.73.8.5249-5251.2005>>.

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, out. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741631008X>>.

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, p. 10, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2818646&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DEROOST, K.; PHAM, T.-T.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. The immunological balance between host and parasite in malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 2, p. 208–257, mar. 2016. Disponível em: <<http://femsre.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/femsre/fuv046>>.

DI LORENZO, A.; LIN, M. I.; MURATA, T.; LANDSKRONER-EIGER, S.; SCHLEICHER, M.; KOTHIYA, M.; IWAKIRI, Y.; YU, J.; HUANG, P. L.; SESSA, W. C. eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 24, p. 5541–52, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24046447>>.

DUDEK, S. M.; GARCIA, J. O. E. G. N. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. p. 1487–1500, 2001.

DULUC, L.; WOJCIAK-STOTHARD, B. Rho GTPases in the regulation of pulmonary vascular barrier function. **Cell and tissue research**, v. 355, n. 3, p. 675–85, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24599334>>. Acesso em: 19 maio. 2014.

ELIAS, R. M.; CORREA-COSTA, M.; BARRETO, C. R.; SILVA, R. C.; HAYASHIDA, C. Y.; CASTOLDI, Â.; GONÇALVES, G. M.; BRAGA, T. T.; BARBOZA, R.; RIOS, F. J.; KELLER, A. C.; CENEDEZE, M. A.; HYANE, M. I.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R.; FIGUEIREDO-NETO, A. M.; REIS, M. A.; MARINHO, C. R. F.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N. O. S. Oxidative Stress and Modification of Renal Vascular Permeability Are Associated with Acute Kidney Injury during P. berghei ANKA Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

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.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, n. 6916, p. 629–635, 12 dez. 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01148>>.

EUGENIN, E. A.; BASILIO, D.; SÁEZ, J. C.; ORELLANA, J. A.; RAINE, C. S.; BUKAUSKAS, F.; BENNETT, M. V. L.; BERMAN, J. W. The Role of Gap Junction Channels During Physiologic and Pathologic Conditions of the Human Central Nervous System. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 499–518, set. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11481-012-9352-5>>.

FAVIER, A. E.; CADET, J.; KALYANARAMAN, B.; FONTECAVE, M.; PIERRE, J.-L. (ed.). **Analysis of free radicals in biological systems**. Basel: Birkhäuser Basel, 1995.

FAVRE, N.; DA LAPEROUSAZ, C.; RYFFEL, B.; WEISS, N. A.; IMHOF, B. A.; RUDIN, W.; LUCAS, R.; PIGUET, P. F. Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 12, p. 961–968, out. 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457999805139>>.

FERNANDES, D. C.; WOSNIAK, J.; PESCATORE, L. A.; BERTOLINE, M. A.; LIBERMAN, M.; LAURINDO, F. R. M.; SANTOS, C. X. C. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **AJP: Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C413–C422, 13 set. 2006. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00188.2006>>.

FREEMAN, B. D.; MARTINS, Y. C.; AKIDE-NDUNGE, O. B.; BRUNO, F. P.; WANG, H.;

TANOWITZ, H. B.; SPRAY, D. C.; DESRUISSEAUX, 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. e1005477, 31 mar. 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005477>>.

GARCIA-MATA, R.; BOULTER, E.; BURRIDGE, K. The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 8, p. 493–504, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3153>>.

GIANNOTTA, M.; TRANI, M.; DEJANA, E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. **Developmental cell**, v. 26, n. 5, p. 441–54, 16 set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24044891>>. Acesso em: 30 abr. 2014.

GILLRIE, M. R.; RENAUX, B.; RUSSELL-GOLDMAN, E.; AVRIL, M.; BRAZIER, A. J.; MIHARA, K.; DI CERA, E.; MILNER, D. A.; HOLLENBERG, M. D.; SMITH, J. D.; HO, M. Thrombin Cleavage of Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Inhibits Cytoadherence. **mBio**, v. 7, n. 5, p. e01120-16, 2 nov. 2016. Disponível em: <<http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.01120-16>>.

GOOD, M. F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C. R. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 69–99, 2005.

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.

GRINNELL, K. L.; HARRINGTON, E. O. Interplay between FAK, PKC δ , and p190RhoGAP in the regulation of endothelial barrier function. **Microvascular Research**, v. 83, n. 1, p. 12–21, jan. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026286211000677>>.

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

GUPTA, H.; AFSAL, M. P.; SHETTY, S. M.; SATYAMOORTHY, K.; UMAKANTH, S. Plasmodium vivax infection causes acute respiratory distress syndrome: a case report. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, 29 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/6813>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2010.10.005>>.

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, jan. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751910002870>>.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 21, p. 247–269, 2005.

KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. **Nature Reviews**

Cancer, v. 10, n. 3, p. 194–204, 11 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2803>>.

KHAITLINA, S. Y. **Functional specificity of actin isoforms** *International Review of Cytology*, 2001. .

KOUKLIS, P. Cdc42 Regulates the Restoration of Endothelial Barrier Function. **Circulation Research**, v. 94, n. 2, p. 159–166, 6 fev. 2004. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000110418.38500.31>>.

LACERDA-QUEIROZ, N.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunopatogênese da malária cerebral. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 44, n. 1, p. 13–9, 2008.

LAGASSE, H. A. D.; ANIDI, I. U.; CRAIG, J. M.; LIMJUNYAWONG, N.; POUPORE, A. K.; MITZNER, W.; SCOTT, A. L. Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 5, p. 659–671, 1 maio 2016. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.4HI0315-130RRR>>.

LI, N.; MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Actin binding proteins in blood-testis barrier function. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 22, n. 3, p. 238–47, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25887390>>.

LIN, B.-H.; TSAI, M.-H.; LII, C.-K.; WANG, T.-S. IP3 and calcium signaling involved in the reorganization of the actin cytoskeleton and cell rounding induced by cigarette smoke extract in human endothelial cells. **Environmental Toxicology**, p. n/a-n/a, mar. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/tox.22133>>.

LUCAS, R.; VERIN, A. D.; BLACK, S. M.; CATRAVAS, J. D. Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury. **Biochemical pharmacology**, v. 77, n. 12, p. 1763–72, 15 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428331>>. Acesso em: 30 abr. 2014.

MCKAYED, K.; SIMPSON, J. Actin in Action: Imaging Approaches to Study Cytoskeleton Structure and Function. **Cells**, v. 2, n. 4, p. 715–731, 14 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4409/2/4/715/>>.

MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. **Physiology Reviews**, v. 86, p. 279–367, 2006.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–9, 7 fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832955>>.

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

NIELSEN, M. S.; NYGAARD AXELSEN, L.; SORGEN, P. L.; VERMA, V.; DELMAR, M.; HOLSTEIN-RATHLOU, N.-H. Gap Junctions. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. 88p. 110–113.

NIKURA, M.; INOUE, S.-I.; KOBAYASHI, F. Role of Interleukin-10 in Malaria: Focusing on Coinfection with Lethal and Nonlethal Murine Malaria Parasites. **Journal of Biomedicine and**

Biotechnology, v. 2011, p. 1–8, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/383962/>>.

O'DONNELL, J. J.; BIRUKOVA, A. A.; BEYER, E. C.; BIRUKOV, K. G. Gap Junction Protein Connexin43 Exacerbates Lung Vascular Permeability. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100931, 26 jun. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0100931>>.

OBERLI, A.; ZURBRÜGG, L.; RUSCH, S.; BRAND, F.; BUTLER, M. E.; DAY, J. L.; CUTTS, E. E.; LAVSTSEN, T.; VAKONAKIS, I.; BECK, H.-P. Plasmodium falciparum Plasmodium helical interspersed subtelomeric proteins contribute to cytoadherence and anchor P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 to the host cell cytoskeleton. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 1415–1428, out. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12583>>.

OREGAN, N.; GEGENBAUER, K.; OSULLIVAN, J. M.; MALEKI, S.; BROPHY, T. M.; DALTON, N.; CHION, A.; FALLON, P. G.; GRAU, G. E.; BUDDE, U.; SMITH, O. P.; CRAIG, A. G.; PRESTON, R. J. S.; O'DONNELL, J. S. A novel role for von Willebrand factor in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Blood**, v. 127, n. 9, p. 1192–1201, 3 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2015-07-654921>>.

ORTOLAN, L.; SERCUNDES, M.; DEBONE, D.; BARBOZA, R.; MURILLO, O.; HAGEN, S.; RUSSO, M.; LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M.; AMAKU, M.; MARINHO, C.; EPIPHANIO, S. Predictive Criteria To Study the Pathogenesis of Malaria-1 Associated Ali/Ards in Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–30, 2014.

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS signaling and redox biology in endothelial cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 17, p. 3281–3303, set. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-015-1928-9>>.

PASQUIER, E.; TUSET, M.-P.; SINNAPPAN, S.; CARNELL, M.; MACMILLAN, A.; KAVALLARIS, M. γ -Actin plays a key role in endothelial cell motility and neovessel maintenance. **Vascular Cell**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2015. Disponível em: <<http://www.vascularcell.com/content/7/1/2>>.

PATEL, S. N.; BERGHOUT, J.; LOVEGROVE, F. E.; AYI, K.; CONROY, A.; SERGHIDES, L.; MIN-OO, G.; GOWDA, D. C.; SARMA, J. V.; RITTIRSCH, D.; WARD, P. A.; LILES, W. C.; GROS, P.; KAIN, K. C. C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 5, p. 1133–1143, 12 maio 2008. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20072248>>.

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, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/4158698/>>.

POUVELLE, B.; BUFFET, P. A.; LÉPOLARD, C.; SCHERF, A.; GYSIN, J. Cytoadhesion of Plasmodium falciparum ring-stage-infected erythrocytes. **Nature medicine**, v. 6, n. 11, p. 1264–8, nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11062539>>.

PUNSAWAD, C.; VIRIYAVEJAKUL, P.; SETTHAPRAMOTE, C.; PALIPOCH, S. Enhanced expression of Fas and FasL modulates apoptosis in the lungs of severe P. falciparum malaria patients with pulmonary edema. **International journal of clinical and experimental pathology**,

v. 8, n. 9, p. 10002–13, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617708>>.

RIDLEY, A. J. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. **Journal of Microscopy**, v. 251, n. 3, p. 242–249, set. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jmi.12025>>.

RODRIGUEZ, P. L.; SAHAY, S.; OLABISI, O. O.; WHITEHEAD, I. P. ROCK I-mediated activation of NF- κ B by RhoB. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 11, p. 2361–2369, 2007.

SCHMIDT, T. T.; TAUSEEF, M.; YUE, L.; BONINI, M. G.; GOTHERT, J.; SHEN, T.-L.; GUAN, J.-L.; PREDESCU, S.; SADIKOT, R.; MEHTA, D. Conditional deletion of FAK in mice endothelium disrupts lung vascular barrier function due to destabilization of RhoA and Rac1 activities. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 305, n. 4, p. L291–L300, 15 ago. 2013. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00094.2013>>.

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. e1006054, 7 dez. 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1006054>>.

SHAKHOV, a. S.; VERIN, a. D.; ALIEVA, I. B. Reorganization of endothelial cells cytoskeleton during formation of functional monolayer in vitro. **Cell and Tissue Biology**, v. 8, n. 2, p. 138–151, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1990519X14020096>>.

SHEN, Q.; RIGOR, R. R.; PIVETTI, C. D.; WU, M. H.; YUAN, S. Y. Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. **Cardiovascular Research**, v. 87, n. 2, p. 272–280, 15 jul. 2010. Disponível em: <<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/cvr/cvq144>>.

SMITH, J. D.; ROWE, J. A.; HIGGINS, M. K.; LAVSTSEN, T. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of Plasmodium falciparum -infected erythrocytes. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 1976–1983, dez. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12183>>.

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 & Neurobiology**, v. 186, n. 1, p. 65–72, mar. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569904812003850>>.

SPINDLER, V.; SCHLEGEL, N.; WASCHKE, J. Role of GTPases in control of microvascular permeability. **Cardiovascular Research**, v. 87, n. 2, p. 243–253, 2010.

STAN RADU V. Anatomy of the Pulmonary Endothelium. In: **The Pulmonary Endothelium**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, [s.d.].p. 25–32.

SUKRITI, S.; TAUSEEF, M.; YAZBECK, P.; MEHTA, D. Mechanisms regulating endothelial permeability. **Pulmonary Circulation**, v. 4, n. 4, p. 535–551, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/677356>>.

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.

TAYLOR, W. R. J.; HANSON, J.; TURNER, G. D. H.; WHITE, N. J.; DONDORP, A. M. Respiratory Manifestations of Malaria. **Chest**, v. 142, n. 2, p. 492–505, ago. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369212604644>>.

TIAN, X.; TIAN, Y.; MOLDOBAEVA, N.; SARICH, N.; BIRUKOVA, A. a. Microtubule Dynamics Control HGF-Induced Lung Endothelial Barrier Enhancement. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e105912, 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0105912>>.

USATYUK, P. V.; VEPA, S.; WATKINS, T.; HE, D.; PARINANDI, N. L.; NATARAJAN, V. Redox Regulation of Reactive Oxygen Species-Induced p38 MAP Kinase Activation and Barrier Dysfunction in Lung Microvascular Endothelial Cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 6, p. 723–730, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/152308603770380025>>.

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, jul. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147149221300072X>>.

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, jul. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2005.04699.x>>.

VANDENBROUCKE, E.; MEHTA, D.; MINSHALL, R.; MALIK, A. B. Regulation of Endothelial Junctional Permeability. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1123, n. 1, p. 134–145, 19 mar. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1420.016>>.

VILLEGAS-MENDEZ, A.; GREIG, R.; SHAW, T. N.; DE SOUZA, J. B.; GWYER FINDLAY, E.; STUMHOFER, J. S.; HAFALLA, J. C. R.; BLOUNT, D. G.; HUNTER, C. A.; RILEY, E. M.; COUPER, K. N. IFN- γ -Producing CD4 $^{+}$ T Cells Promote Experimental Cerebral Malaria by Modulating CD8 $^{+}$ T Cell Accumulation within the Brain. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 968–979, 15 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1200688>>.

WANG, J.; PELLING, A. E. An Approach to Visualize the Deformation of the Intermediate Filament Cytoskeleton in Response to Locally Applied Forces. **ISRN Cell Biology**, v. 2012, p. 1–9, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/513546/>>.

WASSMER, S. C.; GRAU, G. E. R. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? **International Journal for Parasitology**, set. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751916302107>>.

WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 5, p. 843–846, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 1–90, abr. 2000. Disponível em: <[http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S0035-9203\(00\)90300-6](http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S0035-9203(00)90300-6)>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report: 2015**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/>>.

YAMADA, M. Interferon- γ : a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, n. 5, p. L1042–L1047, 1 nov. 2004. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00155.2004>>.

YU, J.; MA, Z.; SHETTY, S.; MA, M.; FU, J. Selective HDAC6 inhibition prevents TNF- α -induced lung endothelial cell barrier disruption and endotoxin-induced pulmonary edema. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 311, n. 1, p. L39–L47, 1 jul. 2016. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajplung.00051.2016>>.

ZHANG, J.; WANG, W.; SUN, J.; LI, Q.; LIU, J.; ZHU, H.; CHEN, T.; WANG, H.; YU, S.; SUN, G.; CHEN, W.; YI, D. Gap Junction Channel Modulates Pulmonary Vascular Permeability through Calcium in Acute Lung Injury: An Experimental Study. **Respiration**, v. 80, n. 3, p. 236–245, 2010. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000274384>>.