

Michelle Klein Sercundes

Avaliação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na lesão pulmonar aguda na malária experimental.

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

Orientação: Prof^a. Dra. Sabrina Epiphanyo

São Paulo
2015

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

Sercundes, Michelle Klein

Avaliação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na lesão pulmonar aguda na malária experimental / Michelle Klein Sercundes. – São Paulo, 2014.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Sabrina Epiphânio

Descritores: 1. SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO. 2. MALÁRIA. 3. *PLASMODIUM BERGHEI*. 4. MACRÓFAGOS. 5. NEUTRÓFILOS.

USP/IMTSP/BIB-09/2014.

Dedico esse trabalho com muito carinho aos meus pais, ao meu irmão e ao meu esposo, que sempre estiveram presentes ao longo dessa jornada, apoiando-me e sempre incentivando a busca pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre estar olhando por mim e por me trazer força e conforto todos os dias para conseguir superar as dificuldades e continuar em busca de meus ideais.

À minha família por sempre estar ao meu lado apoiando-me, incentivando-me e permitindo a realização dos meus sonhos. Em especial aos meus pais pelo seu amor imensurável e ao meu irmão Ricardo pelo seu apoio e horas incontáveis de discussões produtivas.

Ao meu esposo Aurélio por toda paciência, amor e companheirismo ao longo dessa jornada e em todos os dias de nossas vidas.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Sabrina Epiphanyo pela oportunidade de estar em seu laboratório, desfrutar dos seus conhecimentos, promover a minha evolução como pesquisadora e cientista e por todo apoio e amizade durante a realização deste projeto.

Às minhas amigas Luana e Daniela pelo apoio em todas as horas críticas, por me ensinarem a levar a vida de maneira mais branda, por dividirem responsabilidades, pela amizade, pelo companheirismo e pela cumplicidade.

Agradeço aos professores Dr Cláudio Romero Farias Marinho, Dr José Alvarez Mosig e Dra Maria Regina D'Império Lima por suas colaborações, ajuda e ensinamentos.

Agradeço ao apoio e ao companheirismo dos meus amigos de pós-graduação: Keitty e Leandro que me introduziram os conhecimentos no campo da malária, aos amigos Rafael, Beatriz, Giovana, Eduardo, Erika Salles, Erika Machado, Sheyla, Flávia, Marcelo, Renato, Aramys e Oscar por me ajudarem em várias etapas deste trabalho, seja colaborando na bancada, em discussões científicas ou nos momentos de descontração e por todo carinho a mim dispensado.

Às professoras Carla Máximo Prado, Karin Kirchgatter e Hiro Goto pelos ensinamentos passados em suas aulas e na minha banca de qualificação, bem como o apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Renato Barboza pela sua amizade, apoio e ensinamento

A Dr^a Silvia Portugal, pesquisadora visitante do nosso laboratório, por seus ensinamentos no campo do PCR em tempo real e em outras técnicas, bem como seu apoio e amizade.

A doutoranda Lígia Gonçalves pela colaboração durante alguns experimentos e pelos seus ensinamentos.

A Prof^a Dra Kátia Perez e Prof^a Dra Iolanda Midea Cuccovia por abrir as portas do laboratório no Instituto de Química, manufaturar os lipossomas dos meus experimentos e compartilhar momentos agradáveis de troca de conhecimento.

Aos técnicos de laboratório Rogério Nascimento, Mariana, Maria Áurea, Eliane Gomes, Israel, Marilene e Cristina por disponibilizar parte do seu tempo apoiando meus experimentos, pelos seus ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr Momtchilo Russo por ceder o espaço do seu laboratório para a utilização de seus equipamentos e aos seus ensinamentos.

A Fapesp pela bolsa concedida e por todo suporte financeiro que permitiu com que esse trabalho fosse realizado.

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

A todos os camundongos DBA/2, BalbC e C57BL/6 que deram suas vidas para realização desse projeto, pelo aprendizado obtido e por todo conhecimento gerado.

“Na vida não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo,
importa o que fazemos de nós”

Chico Xavier

“ Não basta ensinar ao homem uma especialidade,
porque se tornará assim uma máquina utilizável
e não uma personalidade. É necessário que
adquira um sentimento, um senso prático
daquilo que vale a pena ser empreendido,
daquilo que é belo, e do que é
moralmente correto”

Albert Einstein

RESUMO

Sercundes, MK. Avaliação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na lesão pulmonar aguda na malária experimental (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, 2014.

A malária é um problema de saúde global, que hoje acomete aproximadamente 207 milhões de pessoas, e que levou ao óbito cerca de 607.000 indivíduos apenas no ano de 2013. No Brasil, 99% dos casos concentram-se na Amazônia Legal onde infecções por *Plasmodium vivax* são as principais causas da doença e podem ser fatais. Infecções por *Plasmodium* spp. podem levar a um quadro respiratório grave, com complicações pulmonares denominadas lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A LPA/SDRA é caracterizada pela lesão dos alvéolos e do parênquima pulmonar, com perda da função da barreira epitelial do alvéolo e do capilar pulmonar de células endoteliais e, conseqüentemente, presença de edema pulmonar de origem não-cardiogênica. A diminuição da capacidade de trocas gasosas, aumento da atividade leucocitária e de mediadores inflamatórios nos pulmões resultam em insuficiência respiratória. A dificuldade em se estudar a doença em humanos associado ao desconhecimento dos fatores envolvidos na síndrome faz com que essa disfunção pulmonar torne-se mal compreendida e leve cada vez mais pessoas a óbito. O objetivo central do presente trabalho foi reconhecer e caracterizar o perfil leucocitário pulmonar, os fatores inflamatórios e a morte celular que contribuem para o desenvolvimento da LPA/SDRA associada a malária. Neste trabalho foi utilizado como modelo experimental a associação entre camundongos da linhagem DBA/2 e o parasita murino *Plasmodium berghei* ANKA. Neste modelo 30-75% dos camundongos desenvolvem sintomas pulmonares agudos (LPA/SDRA) e os demais morrem tardiamente com hiperparasitemia (HP). Desenvolvemos a partir dos parâmetros respiratórios e da parasitemia um modelo preditivo para classificação dos animais em LPA/SDRA ou HP antes do momento da morte com alta sensibilidade e especificidade. Nossos resultados mostram que os macrófagos alveolares e os neutrófilos estão aumentados de maneira significativa nos animais classificados como LPA/SDRA e que a depleção dessas populações promove a sobrevivência dos animais e o não desenvolvimento da síndrome. Verificamos também que as células TCD4⁺ e TCD8⁺ produzem grandes quantidades de IFN- γ nos animais LPA/SDRA, contudo o sistema imunológico desses animais produz grandes quantidades de IL-10 como forma de regular a resposta inflamatória. Em nosso estudo mensuramos a apoptose no tecido pulmonar e verificamos que os animais com LPA/SDRA possuem um número maior de células morrendo em relação aos animais HP. Vimos também que a apoptose de neutrófilos e células dendríticas ocorrem de maneira significativa no lavado broncoalveolar dos animais LPA/SDRA. O estudo da expressão de genes pró e anti-apoptóticos mostrou que há o aumento da expressão de Casp-3, Casp-9, Bad, Bid, Bak, FADD, CAD e Ripk-1 nos animais LPA/SDRA, enquanto que Bcl-XL e Bcl2 estão mais expressos nos animais HP.

Descritores: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. Malária. *Plasmodium berghei*. Macrófagos. Neutrófilos.

ABSTRACT

Sercundes, MK. Evaluation of the immunopathological mechanisms involved in acute lung injury in experimental malaria (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2014.

Malaria is a global health problem that now affects approximately 207 million people, and led to the deaths of about 607,000 individuals only in 2013. In Brazil, 99% of the cases are concentrated in the Amazon where infections by *Plasmodium vivax* are the major cause of morbidity and which can also be fatal. Infections with *Plasmodium* spp. can lead to a serious respiratory condition including pulmonary complications named as acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). ALI/ARDS is characterized by damage to the alveoli and the lung parenchyma, loss of epithelial barrier function of the alveoli and pulmonary capillary endothelial cells and, consequently, pulmonary edema noncardiogenic origin. Decreased capacity for gas exchange, increased leukocyte activity and inflammatory mediators in the lungs resulting in respiratory failure. The difficulty in studying human disease associated with lack of knowledge of factors involved in the syndrome and makes the pulmonary dysfunction become misunderstood and take more people to death. The central objective of this study was to determine and characterize the lung leukocytes profile, inflammatory factors and cell death that contribute to the development of ALI / ARDS associated with malaria. In this work was used as an experimental model the association between DBA/2 mice strain and the *Plasmodium berghei* ANKA murine parasite. In this model, 30-75% of mice develop acute pulmonary symptoms (ALI/ARDS) and the others died too late with hyperparasitaemia (HP). Developed from the respiratory parameters and parasitaemia a predictive model for classification of animals in ALI/ARDS or HP before the moment of death with high sensitivity and specificity. Our results show that alveolar macrophages and neutrophils were increased significantly in animals classified as ALI/ARDS and the depletion of these populations promotes the survival of the animals and not development of the syndrome. We also observed that CD4⁺ and CD8⁺ T cells produce large amounts of IFN- γ in animals ALI/ARDS, however the immune system of these animals produce large amounts of IL-10 in order to regulate the inflammatory response. In our study we measured apoptosis in lung tissue and found that animals with ALI/ARDS have a larger number of cells dying compared to HP animals. We also saw that apoptosis of neutrophils and dendritic cells occur significantly in BAL of animals ALI/ARDS. The study of the expression of pro and anti-apoptotic genes showed that there is increased expression of Casp-3, Casp-9, Bad, Bid, Bak, FADD, and Ripk CAD-1 in animals ALI/ARDS, as that Bcl XL and Bcl2 are more expressed in HP animals.

Descriptors: Acute Respiratory Distress Syndrome. Malaria. *Plasmodium berghei*. Macrophages. Neutrophils.